



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA

EKILMA MARIA TRAJANO DE OLIVEIRA

VACINAS PARA AMEBÍASE EM FASE CLÍNICA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA

BACHARELADO EM ENFERMAGEM

EKILMA MARIA TRAJANO DE OLIVEIRA

VACINAS PARA AMEBÍASE EM FASE CLÍNICA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de Graduada em Enfermagem.

Orientadora: Vitorina Nerivânia Covello Rehn

Coorientador: Marton Kaique de Andrade Cavalcante

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2022

EKILMA MARIA TRAJANO DE OLIVEIRA

VACINAS PARA AMEBÍASE EM FASE CLÍNICA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de Graduada em Enfermagem.

Aprovado em: 02/05/2022.

BANCA EXAMINADORA

Maria da Conceição Cavalcanti Lira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Catarina Cristóvão Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Este trabalho é dedicado à Amaury Trajano, meu tão querido e amado avô.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Nossa Senhora Aparecida. Obrigada pelo refúgio e consolação dos meus aflitos. Certamente, vós guiastes meus caminhos espirituais e temporais.

Sou grata por existir pessoas iluminadas em minha vida, elas me enchem de amor, carinho, fé e cumplicidade. Sou grandemente abençoada por ter vocês, obrigada à minha querida mãe Vilma, às minhas irmãs, ao meu noivo e aos meus melhores amigos por estarem sempre comigo e acompanhando minha caminhada.

Agradeço aos meus orientadores Profa. Dra. Vitorina Nerivânia Covello Rehn e Marton Kaique de Andrade Cavalcante, por todas as dicas valiosas e que me guiaram a escrever esse trabalho de conclusão de curso.

Agradeço às revisoras, que fizeram parte da minha banca: Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, Dra. Maria da Conceição Cavalcanti Lira e Dra. Ana Catarina Cristóvão Silva. Obrigada pelas sinceras e valiosas orientações, que foram de suma importância para melhorar meu trabalho de conclusão de curso.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, por ter me proporcionado momentos felizes e frustrantes (risos), sei que todos eles foram valiosos para meu crescimento pessoal e profissional.

Por fim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente abrilhantaram meu caminho nessa trajetória, especialmente nesse momento, no qual concretizo um grande sonho: **SER ENFERMEIRA.**

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos" (Marie Curie).

RESUMO

As parasitoses estão entre as maiores causas de mortes no mundo. Dentro delas, a amebíase é reconhecidamente um problema de saúde global, pela sua alta prevalência em países tropicais e subtropicais, onde o agente etiológico é *Entamoeba histolytica*. Os indivíduos infectados podem desenvolver a forma assintomática ou sintomática da doença, sendo difícil o diagnóstico. Dessa forma, alerta-se para a importância da prevenção da infecção, através do investimento em saneamento básico, distribuição de água potável, controle urbanístico, diagnóstico e desenvolvimento de vacinas. As vacinas representam uma forte ferramenta biotecnológica para proteção da população contra a amebíase. Nesse sentido, diversos pesquisadores vêm pesquisando diferentes marcadores em potencial (e.g. lectinas, metaloproteases, lipofosfoglicanos, proteínas ricas em serina). Esta revisão integrativa, objetivou conhecer quais vacinas estão em fase de teste clínico. Para isso, foi delimitado um intervalo de tempo (2016-2021), na base de dados Periódicos da CAPES. Foram utilizados os seguintes descritores (a): Vacina, *Entamoeba histolytica*, teste ou fase clínica, (b) nos idiomas português, inglês e espanhol e (c) cruzados com os operadores booleanos “AND” e “OR”. Foram encontrados 473 artigos, mas apenas 199 foram selecionados para leitura dos resumos. Contudo, não foi encontrado artigos que contemplassem o trinômio: vacina - *Entamoeba histolytica* - fase clínica, ou seja, ainda não há vacinas em fase de teste clínico.

Palavras-chave: Amebíase humana; Profilaxia; *Entamoeba histolytica*.

ABSTRACT

Parasitic infections are among the leading causes of death in the world. Additionally, amoebiasis is recognized as a global health problem, due to its high prevalence in tropical and subtropical countries, where the etiological agent is *Entamoeba histolytica*. Infected individuals can develop the asymptomatic or symptomatic form of the disease, and the diagnosis is difficult to certify. In this way, we are alert to the importance of infection prevention, through investment in basic sanitation, distribution of drinking water, urban control, diagnosis, and vaccine development. Vaccines represent a strong biotechnological tool to protect the population against amebiasis. Thus, several researchers have been researching different potential markers (e.g., lectins, metalloproteases, lipophosphoglycans, serine-rich proteins). This integrative review aimed to know which vaccines are in the clinical trial phase. Thereunto, a time interval (2016-2021) was defined in the CAPES Periodicals database. The following descriptors were used (a): Vaccine, *Entamoeba histolytica*, test or clinical phase, (b) in Portuguese, English and Spanish, and (c) crossed with the Boolean operators “AND” and “OR”. A total of 473 articles were found, but only 199 were selected for reading the abstracts. However, no articles were found that contemplated the trinomial: vaccine - *Entamoeba histolytica* - clinical phase, that is, there are still no vaccines in the clinical test phase.

Keywords: Human amoebiasis; Prophylaxis; *Entamoeba histolytica*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Amebíase e agente etiológico	15
2.2 Epidemiologia.....	17
2.3 Manifestações clínicas e diagnóstico.....	19
2.4 Tratamento.....	21
3 OBJETIVO	23
4 ARTIGO	25
6 CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO A – NORMAS DA REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO	37

1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Entamoeba histolytica* é um parasito intestinal reconhecido como agente etiológico da amebíase humana (XIMÉNEZ *et al.*, 2010). Em suma, as infecções causadas por esse patógeno são frequentemente assintomáticas, contudo, a doença em sua forma intestinal invasiva, apresenta manifestações clínicas caracterizadas por um longo período de cólicas, dor abdominal, perda de peso e diarreia aquosa ou sanguinolenta (HAQUE *et al.*, 2003).

E. histolytica é considerada uma das três principais de causas de morte por parasitose no mundo, tornando-se cada vez mais comum em países não endêmicos, devido ao aumento de viagens e migrações para países desenvolvidos (KANTOR *et al.*, 2018). Dessa forma, essa doença diarreica aguda é considerada um problema de saúde mundial, e vem afetando cerca de 50 milhões de indivíduos e causando mais de 100 mil mortes por ano (OMS, 1997).

Segundo o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) dos Estados Unidos da América (USA), *E. histolytica* é classificada na categoria B de defesa biológica prioritária, pois apresenta alta resistência ao cloro, estabilidade no meio ambiente e para estabelecer a infecção basta o hospedeiro entrar em contato com uma baixa quantidade de formas infectantes do parasita (NIAID, 2022). Ademais, esse protozoário, apresenta-se como uma forte ameaça devido à sua fácil disseminação, através dos alimentos e reservatórios de água contaminados (NIAID, 2022).

Patologicamente, *E. histolytica* pode causar mortes celulares no hospedeiro e gerar uma resposta inflamatória devastadora (HANQUE *et al.*, 2003). Além disso, na terapêutica é visto comumente a utilização de fármacos nitroimidazóis, mas essa classe pode apresentar diversos efeitos colaterais, sendo necessário o uso de outros medicamentos para curar a infecção, contudo o tratamento se mostra eficaz em cerca de 40-60% dos pacientes (PETRI, 2003).

Dessa forma, essa doença negligenciada requer uma solução. Visto que os fármacos tradicionais não apresentarem os efeitos e eficácia desejados (MARTINEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Ademais, diversas pesquisas vêm sendo realizadas, com o intuito de desenvolver vacinas para proteção contra *E. histolytica*, esperando-se que possam vir a ser utilizadas para prevenção da infecção, mas ainda não há vacinas disponíveis comercialmente (SHIRLEY *et al.*, 2019).

Por outro lado, existem vacinas sendo desenvolvidas, que são baseadas em Lectina-Gal que mostram ser promissoras em modelos *in vivo* (QUACH; PIERRE; CHADEE, 2014). Adicionalmente, vacinas baseadas na proteína recombinante PEΔIII-LC3-KDEL3, que participam da prevenção da amebíase invasiva, resposta inflamatória excessiva e ativa as respostas protetoras também em modelo animal (MARTINEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

Sob esta análise, é necessário o entendimento da ciência e tecnologia que vem sendo desenvolvida para a resolução da tal problemática mundial. Assim como, é necessário saber como está o andamento dessas vacinas aplicadas à prevenção de infecções por *E. histolytica*, de acordo com os níveis de pesquisa clínica para o desenvolvimento de novos fármacos. Portanto, este trabalho tem como objetivo conhecer quais vacinas para amebíase humana avançaram para a fase clínica de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amebíase e agente etiológico

As parasitoses representam uma das principais causas de mortalidade globais, contabilizando cerca de 3 milhões de mortes anualmente (RODRIGUES; CARNEIRO; ATHAYDE, 2013). Nos países em desenvolvimento, as parasitoses intestinais são consideradas um sério problema de saúde pública, as quais podem ser causadas por protozoários ou helmintos e acarretam diversos efeitos na saúde do infectado (SAITO; RODRIGUES, 2012). No Brasil, observa-se uma alta prevalência de parasitoses, devido às condições sanitárias precárias, estilos de vida e condições de saúde em determinados locais (ESTEVES, 2013; ANTUNES, 2020).

Entre as parasitoses, destaca-se a amebíase, que é uma infecção causada pelo protozoário altamente patogênico *E. histolytica*, sendo tradicionalmente conhecido como ameba (ALMEIDA *et al.*, 2020). Esse agente etiológico atua como um organismo comensal, mas pode invadir os tecidos e originar formas patológicas intestinais e extra-intestinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Biologicamente, existem diversas espécies de amebas presentes no intestino grosso dos humanos, como as seguintes: *Entamoeba coli*, *Entamoeba gingivalis* e o complexo *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*, *E. díspar*, *E. mochkovskii* e *E. bangladeshi*), que apresenta espécies morfologicamente idênticas em microscópio óptico (NEVES, 2012).

E. histolytica é a única espécie potencialmente perigosa para os humanos, sendo considerado o agente etiológico da amebíase (SILVA; GOMES, 2011; LEITE, 2015). Essa espécie é classificada no Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Gymnamoebia, Ordem Amoebida, Subordem Tubulina, Família Entamoebidae e Gênero *Entamoeba* (REY, 2008).

E. histolytica apresenta, reconhecidamente, dois estágios evolutivos os “cisto” e “trofozoíto” e duas formas de transição o “pré-cisto” e “metacisto” (NEVES, 2012).

Os cistos são estruturas esféricas e transparentes com aproximadamente 8 - 20 µm de diâmetro. Apresentam uma parede de quitina, consideravelmente rígida e vacúolos de glicogênio. Os núcleos são vesiculares, esféricos, podem ter número variável (de um a quatro), bem como apresentam até 3 corpos cromatóides com formato de bastonetes (FREITAS, 2007). Além disso, sabe-se que os cistos são as

formas infectantes e podem permanecer estáveis até meses, a depender das condições ambientais em que estão (RAVDIN, 1988).

O metacisto é a forma de transição liberada pelo cisto, no processo de desencistamento, no intestino delgado, porém esse mecanismo ainda não é tão elucidado. Esses metacistos passam por sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, que resultam em oito trofozoítos metacísticos (FREITAS, 2007).

Os trofozoítos, são móveis, unicelulares e seu tamanho é maior em comparação com os cistos, variam de 10 - 40 μm de diâmetro, contudo em alguns casos podem chegar a 60 μm , como no caso das formas invasivas. Essa forma evolutiva, apresenta apenas um núcleo, membrana nuclear, cromatina uniforme e finos grânulos na periferia do envoltório nuclear. São estruturas pleomórficas e se alimentam através de fagocitose e pinocitose. Quando é visto a partir de infecções invasivas, seu citoplasma é preenchido por hemácias (FREITAS, 2007). A mobilidade das amebas é permitida pelos pseudópodes e a energia utilizada para a locomoção é pela via anaeróbica da glicose e piruvato (STANLEY, 2003).

Os pré-cistos são originados a partir dos trofozoítos, quando estes se desprendem do epitélio intestinal e são diferenciados. Esse processo é chamado de encistamento, que ocorre no cólon do hospedeiro. Os pré-cistos são a forma de transição entre os trofozoítos e cistos (FREITAS, 2007). Essa forma de transição é arredondada, e seu tamanho é menor que a do trofozoíto. Apresenta citoplasma e cromatóide no formato de bastonete. Eles sofrem uma série de divisões celulares até formar os cistos e serem expulsos do organismo e completando o ciclo de biológico do parasito (RAVDIN, 1998).

E. histolytica é a responsável pelos casos de amebíase, e as outras espécies não se relacionam com a doença, contudo, a *E. dispar* pode estar associada com danos na mucosa do intestino, mas é considerada de baixa virulência. Os trofozoítos são invasivos e podem se aderir ao epitélio, causar ulcera e se espalhar para outros órgãos pela corrente sanguínea (através do sistema da veia porta). Essas estruturas podem migrar para diferentes locais, tais como: peritônio, pulmão, fígado, cérebro entre outros. A adesão dessa forma evolutiva se dá através de uma lectina Gal/GalNAc, que vão se ligar de forma específica em resíduos de galactose e N-acetil-D-galactosamina (HAQUE *et al.*, 2003; CORNICK; CHADEE, 2017).

De Forma geral, a transmissão da amebíase pode se dar pelos dois estágios evolutivos, ou seja, pelo cisto ou trofozoíto. A transmissão pode acontecer através da

ingestão de cistos. Contudo, a forma mais comum de infecção é pelas mãos contaminadas com resíduos fecais. Ademais, também pode ocorrer pela ingestão de comidas e águas contaminadas. Atualmente, também existem investigações que comprovam a infecção por exposição às fezes durante a prática sexual (HUNG; CHANG; JI, 2012).

2.2 Epidemiologia

As infecções causadas por *E. histolytica* são consideradas um grande problema de saúde pública, sendo reconhecidamente a terceira maior causa de mortes entre as doenças parasitárias (GHOSJ; PADALIA; MOONAH, 2019). Estima-se que aproximadamente 10% da população esteja infectada por *E. histolytica*. Além disso, estima-se que a cada ano ocorrem 50 milhões de casos invasivos desse quadro de infecção pelo patógeno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Mundialmente, cerca de 90% das infecções causadas por esse protozoário são clinicamente assintomáticas (STAUFFER; RAYDIN, 2003). Contudo, mesmo silenciosa, essa amebíase é devastadora, causando aproximadamente 100 mil mortes por ano (STAUFFER; RAYDIN, 2003).

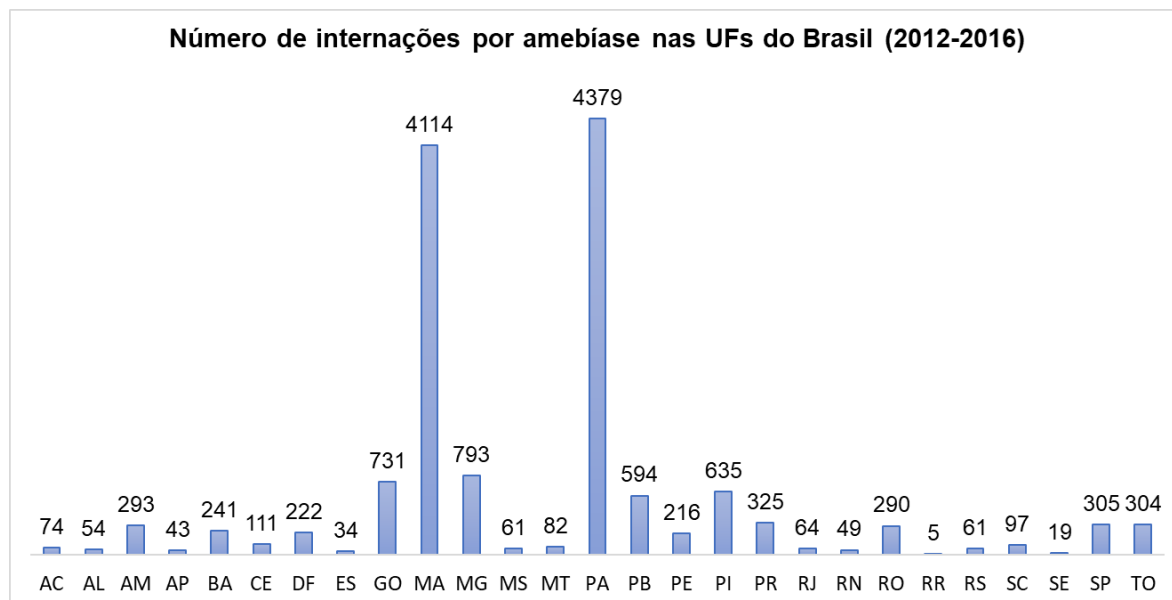
Acerca da prevalência dessas infecções, elas são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais, e certamente são influenciadas pelas condições precárias de higiene, educação sanitária e qualidade dos alimentos das populações subdesenvolvidas, embora também seja observado uma alta prevalência em países de clima frio, devido às condições inadequadas de higiene (NEVES, 2004).

Na América do Sul, a Colômbia, Equador, Peru e Chile são países bastante atingidos, apresentando altas taxas de amebíase. Esses dados, são principalmente obtidos através de exames parasitológicos, dessa forma, não é possível ter uma prevalência real de infecções pelo parasita (REY, 2008).

No Brasil, o número de infectados por *E. histolytica* tem grande diversidade entre as regiões, assim como é visto uma variação na sintomatologia dos acometidos por amebíase (NEVES, 2004). Recentemente, Souza *et al.*, (2019) realizaram um levantamento nos dados epidemiológicos disponíveis no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (SUS). Neste trabalho, foi possível identificar um total de 14.268 casos de internações por amebíase no Brasil no período de 2012-2016 (SOUZA *et al.*, 2019).

A área da Amazônia é a que apresenta maior prevalência de amebíase, com cerca de 19%, sendo justificada pelas condições precárias econômicas e de acesso à saúde pública, consequentemente ao diagnóstico e tratamento adequado (SOUZA *et al.*, 2019). Enquanto isso, a região sul e sudeste do Brasil apresenta menor prevalência (2,5-11%), devido ao maior índice desenvolvimento social e econômico local (SOUZA *et al.*, 2019). Nessa escala, de maior para menor prevalência de amebíase, se localizam nas regiões norte, nordeste, sul e sudeste respectivamente (SOUZA *et al.*, 2019). Na Figura 1, é possível observar os números por Unidades Federativas (UFs) do Brasil.

Figura 1 - Número de internações por amebíase nas UFs do Brasil, no período de 2012 a 2016.



Fonte: Adaptado Souza *et al.*, 2019.

Historicamente, um caso marcante foi a água contaminada na Feira Mundial de Chicago nos EUA em 1993, devido o encanamento inadequado do evento. Esse episódio resultou em mil casos de infecções e mais de cinquenta mortes. No contexto brasileiro os surtos são subnotificados, pela falta de solicitações de testes laboratoriais para o parasita (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2001).

Dessa forma, é necessário o investimento em educação e promoção em saúde, para informar a população em geral as medidas profiláticas, assim como o investimento governamental para o melhoramento das condições de saneamento

básico e abastecimento de água no país (SOUZA *et al.*, 2019). Além disso, é necessário o investimento em diagnóstico.

2.3 Manifestações clínicas e diagnóstico

Os sintomas da amebíase se enquadram como uma colite mucosa ou Síndrome do cólon irritável, que podem possuir diversas causas. As infecções por *E. histolytica* pode estar presente ou não nessas causas da síndrome, sendo o diagnóstico bastante difícil (REY, 2008). Ressalta-se que apenas 10-20% dos infectados desenvolvem sintomas na infecção (NGOBENI *et al.*, 2017).

Dessa forma o diagnóstico seguro é feito através de algumas condições, como: sintomas semelhantes com essa protozoose; identificação de trofozoítos ou cistos; diferenciar quando possível *E. histolytica* de *E. díspar*; apresentar teste sorológico positivo; e resposta efetiva a terapia antiamebiana (REY, 2008).

Visto que a maioria das pessoas desenvolve a forma assintomática da doença, mas geralmente podem aparecer alguns sintomas após a ingestão dos cistos, como: alternância entre constipação e diarreia, flatulência e dor abdominal (PEARSON, 2020).

Além disso, é possível observar outras manifestações clínicas, de acordo com o estágio que se encontra a infecção. No estágio da amebíase luminal, é associado as infecções assintomáticas (SHIRLEY *et al.*, 2018).

A infecção intestinal sintomática, no estágio da colite amebiana, é observada sintomas como diarreia aquosa ou sanguinolenta, associada a dores e perda de peso. Na forma aguda, pode ser visto sintomas semelhantes à doença inflamatória intestinal (SHIRLEY; MOONAH, 2016).

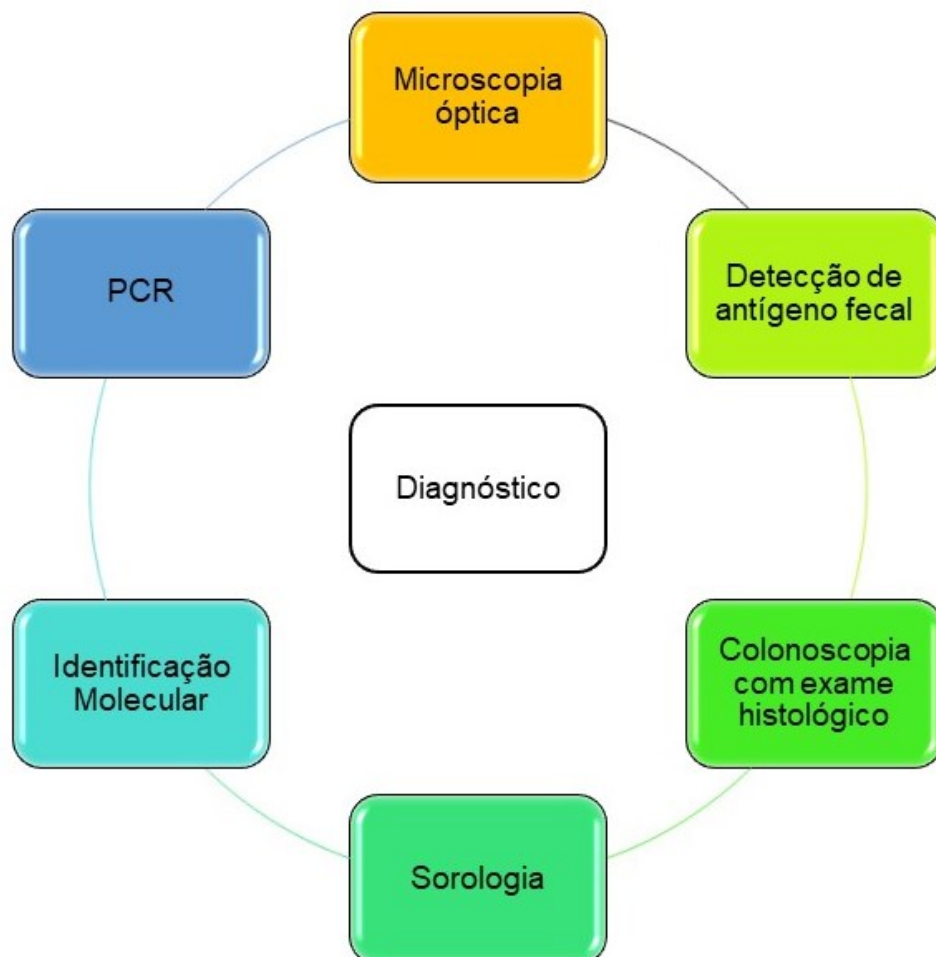
Nessa fase, a amebíase pode ser limitada ao cólon ascendente ou seco, podendo causar até perfuração do epitélio por colônias, peritonite e necrose intestinal (SHIRLEY; MOONAH, 2016). Os pacientes ainda podem apresentar uma aparência febril, intoxicados, hipotensos, dor abdominal e sinais de peritonismo. No caso da colite amebiana fulminante a letalidade é bastante elevada variando de 40-89% (SHIRLEY; MOONAH, 2016).

Nos casos de amebíase extra intestinal, o sintoma mais comum é o abscesso hepático amebiano, que é formado a partir da disseminação dos trofozoítos no fígado. São sintomas comuns, febre, dor disenteria concomitante ou sintomas

gastrointestinais. Assim como pode ser observado hepatomegalia (CORDEL *et al.*, 2013).

Nesse contexto, existem diversas formas para o diagnóstico de amebíase (Figura 2). Na história das infecções amebianas, elas eram comumente diagnosticadas por microscopia óptica a partir de amostras (fezes, soros e exsudatos), as quais eram analisadas acerca da presença de trofozoítos ou cistos, contudo, este método se mostrou incapaz de diferenciar *E. histolytica* e *E. dispar* (STANLEY, 2003; NEVES, 2004). Além disso, este método consome muito tempo e depende de um microscopista qualificado (NEVES, 2004).

Figura 2 – Esquema das técnicas de diagnóstico mais comuns para Amebíase.



Fonte: Oliveira, 2022.

Ademais, ainda é difícil para os hospitais e clínicas fazer a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar*, pois elas são parecidas morfolologicamente (NEVES, 2004).

Todavia, para os exames morfológicos, a Organização Mundial da Saúde recomenda que os laudos sejam dados como cistos ou trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* (NEVES, 2004).

Atualmente, existem diversos métodos para o diagnóstico como, por exemplo, a detecção de antígeno fecal, sorologia, estudos moleculares de fezes e colonoscopia com exame histológico são utilizados na clínica (CHOU; AUSTIN, 2020).

A detecção de antígeno fecal é uma técnica relativamente simples, apresenta um resultado rápido e consegue diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*. Comercialmente, é possível encontrar diversos kits disponíveis que utilizam o ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência ou radioimunoensaio, tendo sensibilidade de até 88% (SHIRLEY *et al.*, 2018; SAIDIN *et al.*, 2019; SPADAFORA *et al.*, 2016).

A sorologia não é utilizada para diferenciar uma infecção aguda e uma prévia, bem como não é possível identificar no soro os anticorpos com menos de uma semana de infecção, contudo é uma técnica com alta sensibilidade e rápida (SHIRLEY *et al.*, 2018; CHOU; AUSTIN, 2020).

O padrão ouro no diagnóstico são os testes moleculares de fezes, com altíssima sensibilidade (>92%) e especificidade (>89%). Embora sejam testes maravilhosos, eles possuem um alto custo, devido exigirem equipamentos caros e mão-de-obra qualificada (SHIRLEY *et al.*, 2018; CHOU; AUSTIN, 2020).

O diagnóstico por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), se apresenta como um teste molecular bastante utilizado, entre os testes moleculares. Apresentam alta sensibilidade, em relação ao método morfológico, sendo capaz de diferenciar as espécies de *Entamoeba* (STANLEY, 2003).

A colonoscopia com exame histológico pode ser utilizada para o diagnóstico, porém não é comum, pois não é utilizado na rotina laboratorial, contudo é utilizado para identificar as causas dos sintomas da amebíase, que é caracterizada por úlceras, erosões amebianas e presença histológica de trofozoítos e/ou cistos (SHIRLEY *et al.*, 2018; CHOU; AUSTIN, 2020).

Ademais, pode ser necessário a combinação de métodos laboratoriais para o diagnóstico adequado (SHIRLEY *et al.*, 2018).

2.4 Tratamento

O diagnóstico e tratamento adequados são necessários para o combate das infecções causadas por *E. histolytica*, considerando que os portadores sem sintomas clínicos podem desenvolver a forma invasiva da doença e disseminá-la (HAQUE *et al.*, 2003).

Entre os fármacos tradicionais utilizados na terapêutica estão as Dicloracetamidas, que atuam na luz intestinal (REY, 2008). Esses compostos são pouco absorvidos no epitélio intestinal, com isso tem ação limitada a mucosa intestinal (REY, 2008). Não apresentam considerável toxicidade para os seres humanos e não possuem contraindicações. No entanto, podem causar flatulência, mas esse sintoma desaparece no fim do tratamento. São exemplos de amebicidas dessa classe: Teclosan (Falmonox), Furamida (diloxamida) e Clefamida (REY, 2008; NEVES, 2004).

Os nitroimidazóis também são uma classe utilizada, apresentam fácil absorção e atuam como amebicidas teciduais. Contudo, devido sua alta absorção é visto que o fármaco chega no intestino grosso em pouca quantidade, sendo ineficiente para eliminar os protozoários que vivem nessa região do trato gastrointestinal. Tendo isso em vista, na terapêutica é feita a combinação de nitroimidazóis com dicloracetamida. São exemplos dessa classe: Tinidazol, Ornidazol, Nimorazol (nitrimidazina) e Metronidazol, (REY, 2008). Sendo o Metronidazol, considerado o tratamento mais adequado para a amebíase intestinal e abscesso hepático amebiano (STANLEY, 2003).

Além disso, ainda são utilizadas as deidroemetina e emetina. A emetina é um alcalóide que é utilizado no tratamento de amebíase historicamente, apresentando resultados rápidos. Contudo, atualmente é preferível o uso de deidroemetina, que é um produto sintético, mais ativo e com menor toxicidade. (REY, 2008).

Ademais, pode se mostrar necessário o uso de antibióticos de amplo espectro para aqueles pacientes que apresentam colite amebiana fulminante ou sinais de peritonite (CHOU; AUSTIN, 2020). Nesses casos mais graves, pode ser necessário a intervenção cirúrgica para perfuração intestinal ou do cólon (CHAVEZ-TAPIA *et al.*, 2009). Além disso, quando não há resposta aos antibióticos, pode ser recorrida à drenagem por cateter (STANLEY, 2003).

Nos casos de infecções pulmonares, é necessário a aspiração do derrame pleural amebiano, bem como a prescrição de antibióticos e metronidazol com um fármaco de ação luminal (FUNG; DOAN, 2005).

Outrossim, as vacinas vêm sendo investigadas em modelos *in vivo* com roedores e primatas, revelando-se resultados bastante significativos. Essas vacinas são baseadas em alvos estratégicos, e futuramente podem ser úteis na imunização contra infecções de *E. histolytica* (KARTOR *et al.*, 2018).

Por fim, é necessário falar sobre a importância da educação e promoção do hábito da higiene e de lavar as mãos, pois são fundamentais para a prevenção e diminuir a disseminação da amebíase e de outras doenças infecciosas. Contudo, a higiene pessoal ainda é um grande desafio em vários locais no mundo, devido aos problemas econômicos e naturais (CDCP, 2022).

3 OBJETIVO

O objetivo deste presente trabalho foi realizar uma revisão integrativa da literatura para conhecer quais vacinas para amebíase humana avançaram para a fase clínica de pesquisa.

4 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA **REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO.

VACINAS PARA AMEBÍASE EM FASE CLÍNICA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Ekilma Maria Trajano de Oliveira¹, Marton Kaique de Andrade Cavalcante^{1,2}, Vitorina Nerivânia Covello Rehn¹

¹ Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

² Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A amebíase humana é uma doença recorrente em vários países. Os infectados pela *Entamoeba histolytica* podem ser assintomáticos ou desenvolver uma forma clínica grave que pode conduzir o paciente ao óbito. Como as condições de saneamento básico eficiente, água potável e o controle do crescimento das cidades e ambientes periurbanos são atitudes políticas negligenciadas, é preciso recorrer a outras medidas profiláticas com caráter cosmopolita. O desenvolvimento de vacinas é uma proposta viável para proteger essas populações, principalmente aquelas que vivem em áreas de risco para amebíase. Vários pesquisadores no mundo vêm testando diferentes grupos de biomoléculas (e.g. lectinas, metaloproteases, lipofosfoglicanos, proteínas ricas em serina) com potencial para o desenvolvimento de vacinas. Com a finalidade de conhecer quais vacinas estão em fase de teste clínico, o presente estudo realizou uma revisão integrativa, no intervalo de 2016 até 2021, na base de dados Periódicos CAPES e com os descritores (a): Vacina, *Entamoeba histolytica*, teste ou fase clínica, (b) nos idiomas português, inglês e espanhol e (c) com os operadores booleanos “AND” e “OR”. 473 artigos foram encontrados e 199 foram selecionados para leitura dos resumos. Até 2021 nenhum artigo contemplou o trinômio: vacina - *Entamoeba histolytica* - fase clínica, ou seja, nenhuma vacina passou para a fase de testes em humanos.

PALAVRAS-CHAVE: Amebíase humana. Profilaxia. *Entamoeba histolytica*.

ABSTRACT

The human amoebiasis is a recurring illness in several countries. People infected with *Entamoeba histolytica* may be asymptomatic or develop a severe clinical form that can lead to death. Because the conditions of efficient basic sanitation, clean water and the control of the growth of cities and peri-urban environments are neglected political attitudes, it is necessary to resort to other prophylactic measures with a cosmopolitan feature. The development of vaccines is a viable proposal to protect these populations, mainly those people living in areas at risk for amebiasis. Various researchers worldwide have been testing different groups of biomolecules (e.g. lectins, metalloproteases, lipophosphoglycans, and proteins high in serine) with potential for vaccine development. With the view to know which vaccines are in the clinical trial phase, the present study carried out an integrative review, from 2016 to 2021, in the

CAPES Periodicals database and with the descriptors (a): Vaccine, *Entamoeba histolytica*, test or clinical phase, (b) in Portuguese, English and Spanish and (c) with the Boolean operators “AND” and “OR”. 473 papers were found and 199 were selected for reading the abstracts. Until 2021, no paper contemplated the trinomial: vaccine - *Entamoeba histolytica* - clinical phase, that is, no vaccine passed to the human testing phase.

KEYWORDS: Human amoebiasis. Prophylaxis. *Entamoeba histolytica*.

INTRODUÇÃO

A *Entamoeba histolytica* é um protozoário parasita, anaeróbio, com transmissão oro-fecal, cosmopolita e responsável pela amebíase em cerca de meio bilhão de pessoas por ano. Entre os 10% que desenvolvem clínica, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 400 a 100 000 enfermos evoluem para o óbito/ano¹⁻³.

Além da forma intestinal, que pode envolver febre, dor de cabeça, vômitos, náuseas, dores abdominais, flatulência e diarreia muco-sanguinolenta, alguns indivíduos podem apresentar manifestações clínicas extra intestinais (pulmão, cérebro, fígado e pele) geralmente em decorrência da disseminação hematogênica da *E. histolytica*^{4, 5}.

Os agravos da amebíase geralmente envolvem a formação de abscessos hepáticos e/ou encefálicos e colite necrosante fulminante, mas é importante assinalar que a colite também pode se agravar pós infecção por SARS-CoV-2⁶ e que, é possível ocorrer amebíase extra intestinal sem o envolvimento inicial dos órgãos do digestório⁷.

Considerando as maiores estimativas mundiais para as prevalências de infecção por *E. histolytica*, Shirley, Farr, Watanabe e Moonah⁸ citaram o México (42%), algumas cidades chinesas (41%) e o Cairo (38%). As prevalências registradas no Brasil não foram consideradas nesse estudo⁹. Costa e colaboradores (2018)¹⁰ afirmam que as prevalências divulgadas em alguns estudos brasileiros são imprecisas, uma vez as metodologias utilizadas não eram capazes de distinguir se as infecções foram provocadas pela *E. histolytica* ou pela *E. dispar*. Zanetti *et al.*¹¹ não só concordam com a afirmação de Costa *et al.*¹⁰, mas também afirmam que a maioria dos casos de amebíase no Brasil é provocada pela espécie *E. dispar*, sendo a prevalência da *E. histolytica* de apenas 3,1%.

Em países pobres e em desenvolvimento ocorre um fluxo contínuo dessas amebas porque, medidas profiláticas como saneamento básico¹² associado ao controle de ocupação dos espaços, para evitar o surgimento das favelas periurbanas¹³, não são priorizados pelas políticas públicas e/ou faltam recursos financeiros para implementação e manutenção dos serviços¹⁴.

Com esse cenário desfavorável, o desenvolvimento de vacina como medida profilática cresce em relevância, uma vez que é uma estratégia que pode ser replicada em diversas realidades socioculturais e políticas.

Segundo Saxena e Prakash¹⁵, as infecções recorrentes pela espécie *E. histolytica* induzem resposta imunológica, mas não são suficientes para impedir que alguns indivíduos desenvolvam as formas graves da amebíase que, via de regra, decorrem da disseminação extra intestinal do parasito.

Recentemente Miler, Tam e Ralston¹⁶ demonstraram que parte da eficiência da disseminação dos trofozoítos pela evasão do sistema imune decorre da trogocitose, a trogocitose é um mecanismo que consiste em uma transferência de parte de proteínas e membranas celulares do hospedeiro para o parasito desta forma o mesmo consegue burlar o sistema imune.

Esse comportamento da *E. histolytica* mostra como é complexa a interação do patógeno com os sistemas de defesa humano e pode auxiliar no desenvolvimento de novas propostas de vacinas.

O presente estudo pretende conhecer quais vacinas para a amebíase humana avançaram para a fase clínica.

METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa qualitativa e descritiva baseada em uma revisão integrativa. Esse tipo de abordagem reúne produções científicas empíricas e teóricas que permitem uma atualização e aprofundamento dos conteúdos sobre um determinado tema¹⁷.

As seguintes etapas foram realizadas para a realização da revisão integrativa: elaboração da pergunta norteadora (estratégia PICO); estratégia de busca na literatura e amostragem; avaliação dos estudos primários incluídos na revisão; análise

e síntese dos resultados da revisão integrativa; revisão/síntese do conhecimento produzido e publicado; apresentação da revisão integrativa¹⁸⁻²⁰.

O estudo partiu da seguinte questão: quais vacinas desenvolvidas para a amebíase humana estão na fase de estudos clínicos?

A busca foi realizada na plataforma de base de dados Periódicos CAPES utilizando descritores em português: (Vacina, *Entamoeba histolytica*, teste ou fase clínica), em inglês (Vaccine, *Entamoeba histolytica*, clinical testing) e em espanhol (Vacuna, *Entamoeba histolytica*, prueba clínica). Todos os descritores foram combinados entre si usando o operador booleano “AND” e/ou “OR”.

A pesquisa ocorreu nos meses de março e abril de 2022 e incluiu apenas artigos científicos completos publicados em português, Inglês e espanhol no período de janeiro de 2011 até dezembro de 2021. Foram excluídos artigos de revisão e outros formatos de publicação científica (teses, dissertações, *short communications*, resumos, livros etc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira fase da revisão, encontrou-se um total de 473 referências, das quais apenas 199 foram selecionadas porque atendiam aos critérios de inclusão. A grande maioria dos artigos selecionados foi publicado em inglês (Quadro 1).

Quadro 1. Cruzamento realizado com descritores controlados, no portal periódicos CAPES.

Descritores por cruzamento	Artigos encontrados	Artigos selecionados
Vacina and <i>Entamoeba histolytica</i> and teste ou fase clínica	2	1

Vaccine and <i>Entamoeba histolytica</i> and clinical testing	467	195
Vacuna and <i>Entamoeba histolytica</i> and prueba and ensayo clínico	4	3
Total	473	199

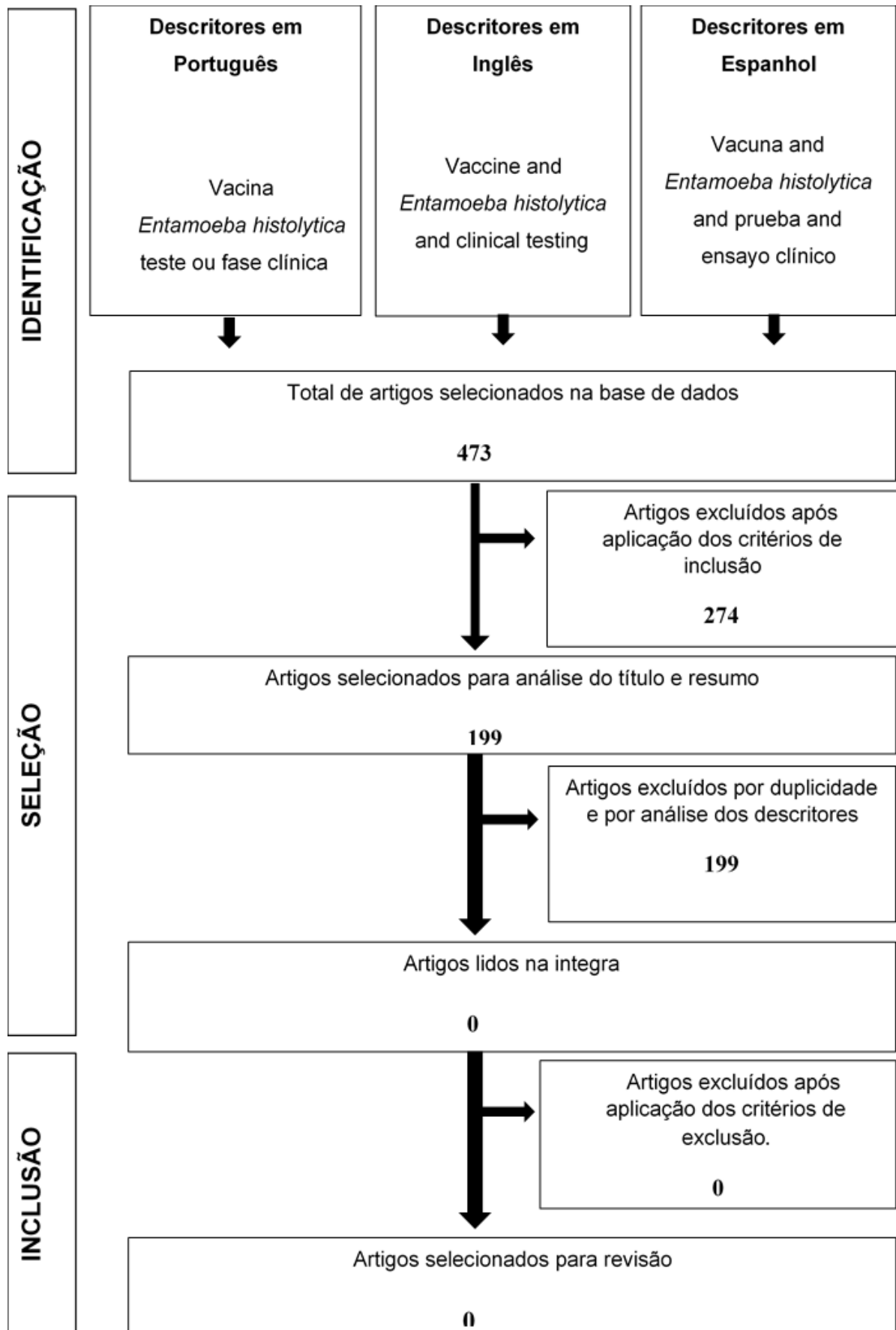
A leitura dos resumos dos 199 artigos selecionados revelou que nenhum deles tratou simultaneamente do trinômio: vacina + *Entamoeba histolytica* + fase clínica, mostrando que nenhuma das propostas de vacina para amebíase humana avançou para a fase de teste em humanos até dezembro de 2021 (Figura 1).

A busca pelo desenvolvimento de vacinas para as formas graves da amebíase humana é antiga, mas os pesquisadores já previam que seria uma tarefa difícil por conta da complexidade da interação parasito-hospedeiro²¹.

Uma das propostas mais antigas testou uma lectina Gal/GalNac e os pesquisadores afirmaram que essa molécula impediu o desenvolvimento de colite e abscesso hepático em animais de laboratório²²⁻²⁵.

Anos depois, em meio a muitas propostas de biomoléculas candidatas a compor uma vacina para amebíase, como metaloproteases, lipofosfoglicanos, proteínas ricas em serina, Min *et al.*²⁶ reafirmam que a subunidade de 170 quilodaltons (kDa), mais especificamente o domínio LecA da lectina Gal/GalNac continua sendo a melhor possibilidade.

Figura 1 - Fluxograma de seleção dos artigos nas bases de dados do portal de periódicos CAPES/MEC.



Os resultados da pesquisa de Martínez-Hernández *et al.*²⁷ indica que de acordo com o teste da vacina recombinante baseada no Antígeno Gal-lectina em uma espécie de hamster, teve ótimas características imunoestimulantes^{28, 29}. Os achados mais importantes da contribuição da vacina PE Δ III-LC3-KDEL3 (proteína recombinante) corresponde a proteção eficaz do tecido hepático e também em relação a capacidade de inibir atividades virulentas amebianas, ou seja, estimula a produção de anticorpos e a resposta inflamatória²⁷.

A proteína recombinante anteriormente citada previne amebíase invasiva, ativa uma resposta protetora em um tempo diminuto e inibi uma resposta inflamatória. Ainda assim, pesquisas estão em andamento de modo a tentar compreender de forma mais aprofundada a respeito da atividade imunológica da vigente vacina em questão, na tentativa de permitir o uso em ensaios clínico²⁷.

Para a formulação e avaliação do adjuvante da vacina da *Entamoeba* segundo a pesquisa de requer uma metodologia de projeto experimental com alto nível de robustez, de modo a interrogar de forma significativa os efeitos de vários fatores, leituras de estabilidade de imunização e físico-química. Ao utilizar uma abordagem DOE (projeto estatístico de experimentos) juntamente com o índice de conveniência, resultou numa otimização da composição de uma formulação adjuvante de ligante de TLR duplo, o que elucidou uma forte durabilidade da resposta imune e eficiência de proteção no modelo de camundongo de colite amebiana³⁰.

Ainda segundo esse estudo foi elucidado a importância da inclusão de ligantes de TLR (GLA e 3M-052) para a eficiência de proteção. O sexo biológico foi determinante nas respostas de imunogenicidade e eficiência. Com a união das descobertas, se resultou numa composição adjuvante de vacina modelo para a adequação ao desenvolvimento pré-clínico avançado³⁰.

Quando se há manifestações extra intestinais e certos dados demográficos como: sexo, raça e histórico de viagens estão presentes a *Entamoeba histolytica* deve ser considerada como um diagnóstico diferencial de colite. Pouco se sabe sobre a resposta imune subjacente à amebíase invasiva. Também se sabe pouco sobre os fatores que permitem que certas pessoas continuem portadoras sem sintomas e outras evoluam para uma doença disseminada³¹.

Ao passo em que mais respostas científicas são reunidas para destacar a patogênese da *E. histolytica* juntamente com a resposta imune à essa infecção, maior a quantidade de proteínas em potencial irá ser investigadas em prol do

desenvolvimento de uma vacina. O potencial de desenvolvimento de uma vacina de *Entamoeba histolytica* é promissor e este fato se justifica devido a certas pessoas possuírem a capacidade de desenvolver uma imunidade potencial³¹.

Alguns mecanismos podem ser a razão pela qual as fêmeas são mais resistentes ao desenvolvimento do abscesso hepático amebiano (ALA), sendo necessário então o uso de combinações de proteínas-alvo como Gal-lectina que impede a aderência da ameba, assim como também das proteínas que aproveitam a resposta imune humoral e que são mediadas por células que podem facilitar a produção de uma vacina. Sendo necessário então uma avaliação da eficácia da resposta imune e proteção em modelos animais³¹.

De acordo com a pesquisa de Abhyankar et al.,³² através de um estudo vacinal em um modelo animal, identificou-se uma reformulação adjuvante de nanolipossomos que possuem agonistas sintéticos de TLR, sendo capaz de estimular uma resposta imune sistêmica e mucosa. Sendo assim, o adjuvante de nanolipossomos contendo agonistas sinérgicos de TLR foi capaz de estimular uma resposta imune humoral e celular sistêmica equilibrada, assim como outra resposta robusta de IgA na mucosa. Sem contar que apoiou a produção de IFN- γ e IL-17, que são duas citocinas (que protegem) bem estabelecidas no modelo de amebíase em camundongos³².

Para se desenvolver uma vacina eficaz não precisa somente de antígenos altamente purificados, mas de uma formulação adjuvante forte e que possa ser testada também em ambientes clínicos³².

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora até o ano de 2021 nenhuma das vacinas propostas tenham avançado para a fase clínica, fica evidente que vários grupos de pesquisadores no mundo estão empenhados nessa causa para que em um futuro próximo o desenho e a produção de vacinas capazes de impedir as formas graves de amebíase humana seja uma realidade.

REFERÊNCIAS

1. Walsh JA, Warren KS. Atenção primária à saúde seletiva: uma estratégia interna para o controle de doenças em países em desenvolvimento. *NEngJMed*. 1979;301:967-74.
2. Tanyukselm M, Petri WA Jr. Diagnóstico Laboratorial de Amebíase. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:713-29.
3. Dorantes JA, López-Becerril JO, Zavala-Cerna MG. Fatal attraction: intestinal amebiasis and COVID-19 as risk factors for colonic perforation: *J Surg Case Reports*. 2021;2021(7):rjab301.
3. Reyes L, León R. Diferenciação de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* e novos achados na patogênese da amebíase intestinal. *Rev. Costarric Cien Med*. 2002;23:161-73.
4. Beaver P, Jung R, Cupp E. *Parasitología clínica*, 2 ed. Edit. Salvat. México, D. F. 1992; p 882. (6) Biolley M, Oberg C. Blastocystis hominis in symptomatic patients at the regional hospital of Temuco Chile. *Bol Chil Parasitol*. 1993;48:25-27.
5. Santos FLN, Soares NM. Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2008;44(4):249-261.
6. Dorantes JA, López-Becerril JO, Zavala-Cerna MG. Fatal attraction: intestinal amebiasis and COVID-19 as risk factors for colonic perforation: *J Surg Case Reports*. 2021;2021(7):rjab301.
7. Nugroho AG, Edijono E. A Rare Case of Primary Pulmonary Amoebiasis without Gastrointestinal Involvement: A Case Report: *J Respirasi*. 2021;7(3):134.
8. Shirley D-AT, Watanabe K, Moonah S. Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(11):e0007744.
9. Shirley D-AT, Farr L, Watanabe K, Moonah S. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(7):ofy161.
10. Costa JO, Resende JA, Gil FF, Santos JFG, Gomes MA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and other enteral parasitic diseases in the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. A cross-sectional study. *São Paulo Med J*. 2018.136(4):319–23.
11. Zanetti AS, Malheiros AF, de Matos TA, dos Santos C, Battaglini PF, Moreira LM, et al. Diversity, geographical distribution, and prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Parasite*. 2021;28:17.

12. Stanley SL. Vaccines for amoebiasis: barriers and opportunities. *Parasitology*. 2006;133(S2):S81–6.
13. Oishi CY, Klisiowicz D do R, Seguí R, Köster PC, Carmena D, Toledo R, et al. Reduced prevalence of soil-transmitted helminths and high frequency of protozoan infections in the surrounding urban area of Curitiba, Paraná, Brazil. *Parasite Epidemiol Control*. 2019;7: e00115.
14. Sousa ACA, Gomes JP. Desafios para o investimento público em saneamento no Brasil. *Saúde Em Debate*. 2019;43(spe7):36–49.
15. Yadav RK., Malhotra S, Duggal N. Immune Dysfunction during Enteric Protozoal Infection: The Current Trends. In: Saxena, S. K, Prakash, H, editors. *Innate Immunity in Health and Disease*. London: IntechOpen; p. 2020.
16. Miller HW, Tam TSY, Ralston KS. *Entamoeba histolytica* Develops Resistance to Complement Deposition and Lysis after Acquisition of Human Complement-Regulatory Proteins through Trogocytosis. *MBio*. 2022;13(2):mbio.03163-21.
17. Soares CB, Hoga LAK, Peduzzi M, Sangaleti C, Yonekura T, Silva DRAD. Integrative Review: Concepts and Methods Used In Nursing. *Rev Da Esc Enferm Da USP*. 2014;48(2):335–45.
18. Santos CM da C, Pimenta CA de M, Nobre MRC. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2007;15(3):508–11.
19. Mendes KDS, Silveira RCCP, Galvão CM. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. *Texto & Contexto-Enferm*. 2008; 17(4):758-64.
20. Galvão CM, Mendes KDS, Silveira RCCP. Revisão integrativa: método de revisão para sintetizar as evidências disponíveis na literatura. Em: Sertório SCM, Brevideilli MM, editores. *Trabalho de conclusão de curso: guia prático para docentes e alunos da área da saúde*. 4ª ed. São Paulo: látrica; 2010. p.105-26.
21. Huston CD, Petri WA. Host-pathogen interaction in amebiasis and progress in vaccine development. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17(9):601–14.
22. Petri WA, Chaudhry O, Haque R, Houpt E. Adherence-Blocking Vaccine for Amebiasis. *Arch Med Res*. 2006;37(2):287–90.
23. Lotter H, Zhang T, e Seydel KB, "Identificação de um epítipo na lectina de 170 kDa de *Entamoeba histolytica* que confere proteção mediada por anticorpos contra amebíase invasiva", *Journal of Experimental Medicine*. 1997; 185(10):1793-1801.
24. Petri Jr, WA e Ravdin JI. "Proteção de gerbos de abscesso hepático amebiano por imunização com a lectina de aderência específica de galactose de *Entamoeba histolytica*," *Infecção e Imunidade*. 1991; 59(1):97-101.

25. Jinno Y, Ogata M, Chaudhary VK et al. "Domínio II mutantes de pseudomonas exotoxina deficiente em translocação", *The Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264(27):15953-15959.
26. Min X, Feng M, Guan Y, Man S, Fu Y, Cheng X, et al. Evaluation of the C-Terminal Fragment of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin Intermediate Subunit as a Vaccine Candidate against Amebic Liver Abscess. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004419.
27. Martínez-Hernández SL, Becerra-González VM, Muñoz-Ortega MH, Loera-Muro VM, Ávila-Blanco ME, Medina-Rosales MN, et al. Evaluation of the PE Δ III-LC3-KDEL3 Chimeric Protein of *Entamoeba histolytica*-Lectin as a Vaccine Candidate against Amebic Liver Abscess. *J Immunol Res*. 2021; 2021:1–12.
28. Fominaya e Wels W. "Target cell-specific transferência de DNA mediada por uma proteína multidomínio quimérica: novo sistema de entrega de gene não viral", *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(18):10560-10568.
29. Liao CW, Chen CA, Lee CN et al. "A vacina de proteína de fusão por domínios de exotoxina bacteriana ligada a um antígeno tumoral gera respostas imunológicas potentes e efeitos antitumorais", *Cancer Research*. 2005; 65(19):9098.
30. Abhyankar MM, Orr MT, Kinsey R, Sivananthan S, Nafziger AJ, Oakland DN and Young MK et al. Optimizing a Multi-Component Intranasal *Entamoeba Histolytica* Vaccine Formulation Using a Design of Experiments Strategy *Frontiers in Immunology*. 2021; 12.
31. Peppelenbosch MP, Kantor M, Abrantes A, Estevez A, Schiller A, Torrent J, Gascon J, et al. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018; 6: 4601420.
32. Abhyankar MM, Noor Z, Tomai MA, Elvecrog J, Fox CB, Petri WA. Nanoformulation of synergistic TLR ligands to enhance vaccination against *Entamoeba histolytica*. *Vaccine*. 2017;35(6):916–22.

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

The **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** (Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine) is a journal devoted to research on different aspects of tropical infectious diseases. The journal welcomes original work on all infectious diseases, provided that data and results are directly linked to human health.

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo follows the directives of the Committee on Publications Ethics (COPE).

Resolution of conflict of interests will be the responsibility of the editor-in-chief, in addition to the two associate editors and the journal's administrative sector. Eventually, area editors and members of the editorial board will be urged to give their opinion, and more rarely, there will be a need for the opinion of a researcher working outside the Institution.

All the submissions are analysed at the arrival by the anti-plagiarism software iThenticate. If problems of plagiarism are found, such as, a large percentage of text identical to that of other publications that comprise entire paragraphs, even if they are articles of the same authors (self-plagiarism), they will be informed of the ethical infraction and the manuscript will be returned to the authors without entering the peer review process.

The journal publishes, besides original articles, reviews, case reports, brief communications and letters to the editor.

The manuscripts must be submitted only written in English, so we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by a scientist with English as a first language or preferably by one of the suggested specialized companies:

authorserv:

<http://www.authorserv.com/>

American Journal Experts:

<http://www.journalexperts.com>

Nature Publishing Group Editing Service:

<https://languageediting.nature.com/>

The receipt of a manuscript with the English usage considered inappropriate can lead to the return of the article to the authors even before the beginning of the review process.

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo established a fee that must be paid by all the manuscripts accepted for publication.

These publication fees are essential to ensure quality, the increment of the journal's impact factor and the number of citations, the maintenance of the electronic manuscript submission and review system and finally the review of the English style and of grammar issues.

The fees will be of US\$400 for original articles and reviews; and of US\$250 for case reports, brief communications and letters to the editor. Only for Brazilian citizens, the fees will be of BRL 1,500.00 for original articles and reviews; and of BRL 1,000.00 for case reports, brief communications and letters to the editor. Once the manuscript has been approved, the corresponding author will receive the instructions for the payment of the publication fee. Thereafter, the corresponding author will receive the receipt of payment to be able to apply for funding agencies reimbursement.

All types of manuscripts should be sent to the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo and they will be peer-reviewed (double-blind system) by two to four reviewers of the Editorial Board and/or ad hoc reviewers.

The decision to accept a publication rests with the editors and is based mainly on the recommendations of those reviewers.

A cover letter stating the following items should be included in the proper place on the submission website: 1) The manuscript and all parts of it have not been submitted elsewhere; 2) There are no financial or other relationships of any of the manuscript authors that might lead to any conflict of interest; 3) The submitted manuscript has been read by all authors carefully, and all authors agree that the manuscript represents their work. 4) Describe sources of funding that have supported the work. Please also describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; collection, analysis and interpretation of data; writing of the paper; and decision to submit it for publication; 5) The corresponding author will be responsible for the communication with the other authors about revisions and final approval of the paper; 6) there is no need of signatures in the cover letter. The manuscripts will be received only by online submission at: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>

On the same site, the authors can check the status of the submission at any time. The electronic file will be used for the editorial assessment and online refereeing, and the editorial decisions on the manuscript will be communicated to the corresponding author. Only the corresponding author will be contacted and always by e-mail, so be sure to designate an author who checks frequently the e-mail account.

Authors may suggest potential reviewers for their work provided that they give their e-mail addresses and affiliations of each scientist they have proposed. Please do not suggest scientists of the same institutions of the authors.

Form and preparation of manuscripts

Important recommendations:

a) In original and review articles, the sum of the number of figures and tables must not exceed six. Exceptionally, and only after consulting the journal staff, the authors may exceed this total number of six (figures + tables).

b) In order to improve the external validity of the manuscripts published in the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, as well as our internationalization process, we urge the authors to avoid the use of names of cities, states and provinces,

especially in the titles of the articles, giving preference and only in cases of extreme need, to the use of regions of a particular country. In the body of the manuscript, authors must locate cities and regions using latitudes and longitudes.

c) Submissions with raw data or extensive supplementary material will have these files stored (during the reviewing process of the manuscript and perpetually, in case of publication), in the journal area at Scielo Data, available at <https://data.scielo.org/dataverse/brrimtsp/>

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo staff will curate and analyze the data to be stored in the Scielo Data repository.

Types of articles:

Original Articles: The text must contain a maximum of 6,000 words including abstract and references. The body of the manuscript should be preceded by a non-structured abstract (with no sub-headings), with a maximum of 500 words. Then, authors should proceed to sections of Introduction, Materials and Methods (containing the research's ethical approval) Results, Discussion and References (limited to 40). Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals. Tables and figures should be referred to in the text, numbered and contain a brief specific title. Figures such as drawings, maps, photographs, photomicrographs or electron micrographs should be planned to suit the size of a single or double page column. Figures in black and white or in color should be submitted in TIF format, with high resolution (1,200 DPI).

Review Articles: Should be presented in the same format of original articles. Review articles are intended to investigators who are experts in a certain field and have made substantial contributions to this specific area of knowledge. This type of manuscript should focus on the description of the state of art, highlighting the major breakthroughs regarding the subject. The number of references are limited to 60.

Brief Communications, Case Reports and Letters to the Editor: Should report new observations of critical medical importance. Brief Communications should follow the same format of original articles, not exceeding 2,500 words. Case Reports should focus on clinical and laboratory findings, summarizing the introduction, limiting

discussion to the essential, calling attention to novelties regarding diagnosis, treatment, outcome of patients, not exceeding 2,000 words. Letters to the Editor should state, from the beginning, why the subject merits this type of publication, highlighting the innovative aspects attained by the research, not exceeding 1,500 words. In these categories of manuscripts (Brief Communications, Case Reports and Letters to the Editor), the number of references is limited to 20, and the attachments, which may be figures (photographs, maps, graphics, etc.) or tables, must not exceed 3 (the sum of figures and tables).

Acknowledgments: Should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Private or Governmental organizations that have provided financial support to the research should be mentioned, together with the grants or contribution numbers and period of validity.

Authors' Contributions: The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo encourages authors to include a statement to specify the individual contributions of each co-author.

As the Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo reviewers work blindly, the Acknowledgments, the Funding and the Authors' Contributions must not be included in the main text of the manuscript, and should be placed in the title page. Those statements will be included in the body of the text on the final version of the article.

References:

The list of references, including only those actually mentioned in the text or tables, should be in Vancouver format, listed in order of the citation in the text, and numbered consecutively in Arabic numerals followed by a dot. The citations on the text must be in superscript format, only the numbers without parentheses.

Example: has been widely applied in clinical practice¹²

Example: according to the protocol used by Silva et al.²¹

References must be formatted as follows:

a) Articles from journals: Last names and initials (only the two first initials) of all authors (unless there are more than six, when only the first six names should be mentioned, followed by et al.), full title of the article, title of the journal (title abbreviations by NLM can be found on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), the year of publication, the volume number, the number of the first and last pages.

Example: Leveau CM, Uez O, Vacchino MN. Spatiotemporal trends of cases of pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in Argentina, 2009-2012. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57:133-8.

Example: Yamamoto L, Santos EH, Pinto LS, Rocha MC, Kanunfre KA, Vallada MG, et al. SARS-CoV-2 infections with emphasis on pediatric patients: a narrative review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2020;62:e65.

b) Articles that have not yet been published, but already exist in the preprint format: Last names and initials (only the two first initials) of all authors (unless there are more than six, when only the first six names should be mentioned, followed by et al.), full title of the article, title of the journal or of the repository (title abbreviations by NLM can be found on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), the year of the preprint submission, followed by the words In Press.

Example: Savarin MT, March JH, Reynolds CJ. Hypertension in pregnancy: from pathophysiology to clinical practice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2021 In Press.

Example: Yin D, Fang L, Liu J, Zhong X, Guo T, Wan X, et al. Characteristics of cytokines in peripheral blood of hospitalized patients with 2019 novel coronavirus. *medRxiv*. 2021 In Press.

c) Books: Last names and initials of all authors, full title of the book, edition, place of publication, the publisher, and the year.

Example: Lewin JK. *Genes and virus*. 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett; 2008.

Citing books is not prohibited, but authors should give preference to citing articles published in indexed international scientific journals.

d) Chapter of books: Last names and initials of all authors of the chapter, full title of the chapter, last names and initials of all authors of the book, full title of the book, edition, place of publication, the publisher, the year, the pages of the chapter.

Example: Ferreira HO. Doença de Chagas. In: Farhat CF, Carvalho ES, Carvalho LH, Succi RC, editores. Infectologia pediátrica. São Paulo: Atheneu; 1998. p.531-7.

Citing chapters of books is not prohibited, but authors should give preference to citing articles published in indexed international scientific journals.

f) Websites: Name of the organization, the full title of the document cited, place of publication (if available), the publisher (if available), the year (if available), date of citing, URL of the precise document cited (not the organization URL).

Example: World Health Organization. Leprosy elimination. [cited 2021 Feb 26]. Available from: http://www.who.int/lep/situation/new_cases/en/

Example: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. [cited 2021 Feb 26]. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf

g) Thesis: The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo will not accept the citation of master of Science, PhD thesis, or similar work.

h) Softwares: The softwares used should not originate references, but the manufacturer and its location (city, State and country) should be cited in the text as is the case for equipments and laboratory reagents:

Example: The SPSS statistical software (version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all the calculations.

Ethical Guidelines:

Articles must state in the Material and Methods section that: 1) informed consent was obtained from all human adult participants and from parents or legal guardians of minors together with the approved consent of the Ethical Commission; 2) a consent term was applied to study participants in the case of children over the age of seven and adolescents besides the consent obtained from parents or legal guardians of minors together with the approved consent of the Ethics Committee; 3) the maintenance of and procedures on experimental animals comply with the guidelines on the use of laboratory animals prevailing in the country of origin.

Numbers:

Numbers that begin a sentence or those that are less than 10 should be spelled out using letters. Centuries and decades should be spelled out, e.g. the Eighties or Nineteenth Century. Laboratory parameters, time, temperature, length, area, mass, and volume should be expressed using digits.

Units:

The International Unit System must be used, with the exception of blood pressure values which are to be reported in mmHg. Please use the metric system for the expression of length, area, mass, and volume. Temperatures are to be given in degrees Celsius. Hours must be abbreviated as h, minutes as min, and seconds as s (all of them without dots after the abbreviated word).

Devices and equipment:

The Materials and Methods section must include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. The sources of all media (i.e., name and location of manufacturer) or components of a new formulation must be provided.

When centrifugation conditions are mentioned, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: brand of the centrifuge (manufacturer), model of the equipment and model of the rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugation force (X g instead of rotations per minute).

For devices and other products, the specific brand or trade name, the manufacturer and their location (city, State, country) should be provided the first time the device or product is mentioned in the text. Thereafter, the generic term (if appropriate) should be used.

Example: QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Hilden, Germany).

Names and identification of drugs and other products:

Authors are asked to use the Recommended International Nonproprietary Name (rINN) for medicinal substances, unless the specific trade name of a drug is actually relevant to the discussion. Generic drug names should appear in lowercase letters in the text. If a specific proprietary drug needs to be identified, the brand name may appear only

once in the manuscript in parentheses following the generic name the first time the drug is mentioned in the text.

The description of new methods should be complete and provide sources of unusual chemicals, reagents, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, authors are asked to include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, plasmids etc.

Patient identification:

The informed consent is not needed if the patient cannot be identified from any material in a manuscript. In the absence of the informed consent, identifying details, such as the patient initials, specific dates, specific geographic exposures, or other identification features (including body features in figures), should be omitted, but this must not alter the scientific meaning.

Important information that is relevant to the scientific meaning should be stated so that the patient cannot be identified, e.g., by stating a season instead of a date, or a region instead of a city.

If a patient can be identified from the material in a manuscript, the informed consent is required. It can be obtained from the patient(s) or their parents/legal guardians in the case of minors.

For children of seven years old or more, beyond the informed consent of the parents/legal guardians, an informed assent of the child should be provided.

The Informed consent requires that the patient has had the opportunity to see and approve the manuscript prior to submission. The written informed consent must state either that the patient has seen and approved the complete manuscript, or that the patient declined to do so.

The patient consent should be attached as an additional file at the time of the manuscript submission. A statement attesting the receipt and archiving of the written consent of the patient should be included in the published article.

Randomized Controlled Trials and Clinical Trials:

The Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo supports the policy of Clinical Trials registration delivered by WHO and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) recognizing the importance, in open access, of these

initiatives for the registration and international knowledge of the information on clinical studies. Therefore, from 2007 on, only papers of clinical research dealing with these issues having an identification number provided by one of the clinical assays validated by established criteria from WHO and ICMJE will be accepted. The addresses can be found in the ICMJE site (<http://www.icmje.org>). The trial registration number should be written at the end of the summary.

Submission of manuscripts:

The manuscripts will be received only by on-line submission at: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>, where the authors can check the status of the submission at any time. The electronic file will be used for the editorial assessment and the online refereeing. The editorial decisions on the manuscript will be communicated to the corresponding author by e-mail.