

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

Efeito do probiótico *Saccharomyces boulardii* em gerbils (*Meriones unguiculatus*)
experimentalmente infectados com *Giardia lamblia*.

Mayana Rodrigues dos Santos Ribeiro

Belo Horizonte – MG
2015

Mayana Rodrigues dos Santos Ribeiro

Efeito do probiótico *Saccharomyces boulardii* em gerbils (*Meriones unguiculatus*)
experimentalmente infectados com *Giardia lamblia*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Área de concentração: Bioquímica e Imunologia Nutricional
Orientadora: Dirce Ribeiro Oliveira
Belo Horizonte – MG
2015

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

(Galileu Galilei)

“A beleza não está na partida nem na chegada, mas na travessia. ”

(Guimarães Rosa)

Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio financeiro Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, pois sem as suas bênçãos eu não chegaria
Muito especialmente a **Dirce e Cidinha**, pelo carinho, atenção, prestatividade e acima de tudo, por me abrirem as portas e acreditarem em mim, me dando a oportunidade de alcançar meus planos.*

*Ao professor **Marcelo** e a professora **Denise Carmona**, pelo ensinamento e atenção dados prontamente sempre que solicitado!*

*Aos estimados **Joãozinho e Edna, Carlos** do biotério, profissionais experientes e que amam o que fazem. Sem vocês não seria possível concluir este trabalho!*

*Aos meus queridos **colegas do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais** que me ajudaram em muitas coisas e me ensinaram tantas outras!*

*Aos grandes **amigos e à família***

*Agradeço aos meus queridos **cachorros**, não por serem simples animais de estimação, mas sim por todas as alegrias e por amenizar o peso de alguns períodos mais difíceis.*

*Aos colegas da **1ª turma do mestrado em Nutrição e Saúde**, que tornaram esta caminhada muito mais agradável!*

*Aos demais **professores** da Pós-graduação em Nutrição e Saúde.*

*Aos meus amados **pais**, pelo amor, e por me dar todas as condições para chegar até aqui e por nunca, em tempo algum, duvidarem da minha capacidade.*

*Ao meu querido **irmão**, que sempre apoiou as minhas escolhas e fez vários momentos ficarem mais leves.*

*Ao **Udmilson**, grande amor da minha vida, por ser meu companheiro de todos os momentos, com você sou capaz de tudo!*

*A **todos vocês**, muito obrigada!*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Variações do número e filo de microrganismos de acordo com a localização no trato gastrointestinal.....	20
Figura 2.	Carga parasitária dos gerbils infectados com <i>G. lamblia</i> tratados ou não com <i>S. boulardii</i>	32
Figura 3.	Fotomicrografia de imunohistoquímica para trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
Figura 4.	Análises morfométricas no intestino delgado de gerbils	33
Figura 5.	Fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração de H&E e objetiva de 10X	34
Figura 6.	Área de produção de muco intestino delgado de gerbils	35
Figura 7	Contagem de células caliciformes/100 células epiteliais no intestino delgado de gerbils	35
Figura 8	Fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração de PAS e objetiva de 40X	36
Figura 9.	Contagem de Linfócitos intraepiteliais (LIE's) /100 células epiteliais no intestino delgado de gerbils	37
Figura 10.	Fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração de H&E e objetiva de 40X	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação esquemática do delineamento experimental.....	29
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

CT – Controle

INT– Infectado tratado com PBS

S. boulardii – *Saccharomyces boulardii*

CDC – *Centers for Disease Control*

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

LAPI – Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais

CEUA - Comissão de Ética no USO de Animais

SLU - Serviço de Limpeza Urbana

PBS – Solução Salina Tamponada

H&E - Hematoxilina e Eosina

PAS - Ácido Periódico de Schiff

ANOVA - Análise de Variância

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

LIE – Linfócito Intraepitelial

LPS – Lipopolissacarideo

NOD2 - Domínio de ligação da oligomerização de nucleótidos 2

MUC- Mucina

SUMÁRIO:

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Lista de abreviaturas	8
Resumo	10
Abstract	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Giardíase: epidemiologia, transmissão e sintomatologia.....	13
1.2 Tratamento contra giardíase	16
1.3 Microbiota e giardíase	17
1.4 Modelo experimental	21
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Delineamento experimental	25
3.1.1 Etapa I – Tratamento pré-infecção.....	26
3.1.2 Etapa II – Ajuste do inóculo e infecção.....	26
3.1.3 Etapa III - Tratamento pós-infecção.....	27
3.2 Eutanásia dos animais e coleta de materiais.....	27
3.3 Histopatologia e morfometria da mucosa Intestinal	27
3.4 Contagem de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> aderidos ao epitélio Intestinal.....	28
3.5 Reação imunohistoquímica e análise quantitativa de trofozoítos	29
3.6 Análise estatística dos dados	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	45
7. REFÊRENCIAS	47

RESUMO

G. lamblia é um protozoário causador da giardíase, uma das mais comuns causas de diarreia em humanos e o tratamento convencional possui muitos efeitos adversos relatados. Este estudo avaliou a ação do probiótico *Saccharomyces boulardii* em gerbils experimentalmente infectados com *G. lamblia*. Foram utilizados 28 gerbils (*Meriones unguiculatus*), machos, de 4 a 6 semanas, divididos em 4 grupos: Controle (CT); Infectado (INT); *S. boulardii* (SB); Infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Os grupos SB e ISB receberam, por gavagem, 1×10^9 UFC/0,1 mL de *S. boulardii* suspenso em PBS, uma vez/dia durante 15 dias. Após esse período, os grupos INT e ISB foram inoculados por gavagem com 1×10^6 trofozoítos/mL da cepa BHRA-93 de *G. lamblia*. Até o 23º dia do experimento os grupos ISB e SB continuaram recebendo o probiótico, quando então todos os grupos foram eutanasiados. A porção proximal do intestino delgado foi coletada, fixada e processada para coloração com Hematoxilina & Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e imunohistoquímica. A altura e a largura das vilosidades, a profundidade das criptas, a área de muco e área de trofozoítos foram calculadas por meio do software ImageJ. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, utilizando-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, Análise de Variância, teste de Tukey para comparação entre os grupos experimentais. Utilizou-se o pacote estatístico GraphPad Software 6.0. Foi observada redução da carga parasitária no grupo ISB $2,2 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$ comparado ao grupo INT $8,16 \times 10^5 \pm 4,2 \times 10^5$ trofozoítos/ml ($p < 0,01$). A área de trofozoítos imunomarcados também se mostrou menor no grupo ISB $1,48 \pm 3,29 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ em relação ao grupo INT $4,96 \pm 6,78 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$). O grupo SB apresentou altura de vilosidades maior que os animais dos outros grupos não havendo diferenças significativas entre os outros grupos. Não houve diferenças de largura de vilosidades e altura de criptas entre os grupos. A área de produção de muco dos grupos SB e ISB foi maior comparado aos grupos CT (e INT ($p < 0,01$)). O grupo INT apresentou menor número de células caliciformes em relação aos outros grupos ($p < 0,01$). O grupo CT apresentou menor número de linfócitos intraepiteliais em relação aos grupos INT e ISB $p < 0,01$, foi observado também maior número de linfócitos intraepiteliais no grupo ISB comparado ao grupo INT e CT ($p < 0,01$). Nossos resultados demonstraram efeito protetor do *S. boulardii* na giardíase com aumento de produção de muco instigando novos estudos para entender os mecanismos envolvidos nesta proteção.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*; *Saccharomyces boulardii*; probiótico.

ABSTRACT

Giardia lamblia is a protozoan that causes giardiasis, one of the most common causes of diarrhea in humans. Many of the adverse effects are given to the conventional treatment, which results in significant disruption thereof. This study evaluated the action of probiotic *Saccharomyces boulardii* in the parasite load of gerbils experimentally infected with *G. lamblia*. 28 gerbils (*Meriones unguiculatus*), male, 4 to 6 weeks were divided into 4 groups: Control (CT); Infected (INT); *S. boulardii* (SB); Infected treated with *S. boulardii* (ISB). The SB and ISB groups received, by gavage, $1 \times 10^9 / 0.1$ CFU/0.1 mL de *S. boulardii* suspension in PBS, 1 once/day for 15 days. After this period, the INT and ISB groups were challenged by gavage with 1×10^6 trophozoites / ml of BHRA-93 strain of *G. lamblia*. Until the 23rd day of the experiment the ISB and SB animals continued to receive the probiotic, whereupon all were euthanized. The proximal small intestine was collected, fixed and processed for staining with Hematoxylin & Eosin (HE), Periodic Acid-Schiff (PAS) and immunohistochemistry. The height and width of the villi, the crypt depth, the area of mucus and trophozoites area were calculated using the ImageJ software. Results were expressed as mean \pm standard deviation, using the normality test Shapiro-Wilk, analysis of variance and Tukey test for comparison between groups. The statistical package GraphPad Software 6.0 was used. Significant reduction in worm burden was observed in the group ISB $2.2 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$ INT group compared to $8.16 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^5$ trophozoites / ml ($p < 0.01$). The trophozoites immunoblotted area was also lower in the ISB group $1.48 \pm 3.29 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ in relation to the INT group $4.96 \pm 6.78 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.05$). The animals treated only with probiotics (SB group) had significantly higher villus height than the animals in the other groups; No differences were found with regard to width of villi and crypts high. Regarding mucus production area of groups SB and ISB was higher compared to the CT and INT groups ($p < 0.01$). INT group had fewer goblet cells compared to other groups ($p < 0.01$). The CT group presented a smaller number of intraepithelial lymphocytes compared to the INT and ISB groups $p < 0.01$. It was also observed greater intraepithelial lymphocytes number on the ISB group compared to the INT group ($p < 0.01$). Our results showed a protective effect of *S. boulardii* in giardiasis prompting new studies to understand the mechanisms involved in this protection.

Keywords: *Giardia lamblia*; *Saccharomyces boulardii*; probiotic.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Giardíase: epidemiologia, transmissão e sintomatologia

Giardia lamblia (sinonímia: *Giardia duodenalis* e *Giardia intestinalis*) é um protozoário flagelado, que parasita o homem e alguns animais domésticos e silvestres, causando a giardíase (LEBBAD *et al.*, 2011). Em 2004, em função de sua elevada prevalência, principalmente em crianças, a doença foi incluída entre as Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (SAVIOLI *et al.*, 2006).

Segundo a OMS mais de 2 bilhões de pessoas são infectados por protozoários intestinais e helmintos no mundo (OMS, 2010). Estima-se que anualmente ocorram 280 milhões de casos sintomáticos de giardíase humana (LANE & LLOYD, 2002), tanto em países em desenvolvimento (SAKSIRISAMPANT *et al.*, 2012) quanto nos desenvolvidos (YODER *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos a estimativa anual foi de 1,2 milhões de casos (SCALLAN *et al.*, 2011) e as hospitalizações em decorrência da doença geraram custos de aproximadamente US\$ 34 milhões (COLLIER *et al.*, 2012). Em Istambul, a prevalência de parasitoses em pacientes admitidos no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina entre 1988 e 2012 foi de 5%, porém 62% destes indivíduos apresentavam o parasito *G. lamblia* (UYSAL *et al.*, 2014). AKLILU *et al.* (2015) ao avaliarem o material fecal de trabalhadores de uma cafeteria na Etiópia, encontraram que 45,3% apresentavam algum tipo de infecção parasitária sendo que 18,8% eram positivos para giardíase.

No Brasil, 96,6% dos avaliados com idade entre quatro e 15 anos recrutados aleatoriamente no assentamento sem terra na cidade de Araras, em São Paulo, apresentaram cistos de *G. lamblia* (LIMA *et al.*, 2013). Ainda no Brasil, no período de outubro de 2010 a fevereiro de 2011 foram coletadas e analisadas amostras de fezes de 100 crianças matriculadas em creche municipais de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, e encontrado 44 resultados positivos para giardíase (CASTRO *et al.*, 2015). Em uma revisão sistemática de artigos científicos observacionais sobre a presença de doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches, verificou-se que a infecção por *Giardia lamblia* foi a parasitose mais prevalente, e que as variáveis que mais vezes mostraram-se associadas ao desenvolvimento de

enteroparasitoses foram a idade da criança, a renda familiar e a escolaridade materna (PEDRAZA, QUEIROZ & SALES, 2014).

Durante o ciclo vital, este parasito apresenta-se sob duas formas distintas: cisto e trofozoíto. A primeira é a forma de resistência, capaz de sobreviver no ambiente sob diversas condições e por longos períodos (AGUILAR-DÍAZ *et al*, 2011). A parede do cisto é composta por carboidratos (principalmente *N*-acetilgalactosamina) e proteínas, e suas fortes interações fazem com que o mesmo resista às várias adversidades do ambiente externo e seu metabolismo é desacelerado e o mantém dormente. (LUJAN *et al*, 1996; PAGET *et al*, 1998).

O trofozoíto é a forma vegetativa, semelhante a uma pêra cortada no sentido do comprimento ou a uma gota. Possui simetria bilateral, mede de 12-15 micrômetros de comprimento, 5-9 micrômetros de largura e 1-2 micrômetros de espessura (GILLIN *et al*, 1996). Apresenta quatro pares de flagelos que emergem do corpo celular em suas faces anterior, posterior, ventral e caudal, responsáveis pela motilidade. Outra organela importante é conhecida como disco ventral, que garante adesão, já que os trofozoítos não invadem o epitélio intestinal do hospedeiro (CARRANZA & LUJAN, 2010; ANKARKLEV *et al*, 2010). Por ser a forma que adere às microvilosidades intestinais, é a responsável pelas manifestações clínicas da doença (ADAM, 2001; ECKMANN, 2003; DAWSON *et al*, 2007).

A transmissão da giardíase ocorre por ingestão de cistos presentes em água ou alimentos contaminados, ou diretamente, de pessoa a pessoa, em locais de aglomeração humana como escolas, creches, orfanatos e asilos, quando as condições higiênico-sanitárias são precárias (FENG & XIAO, 2011), o que constitui também, fator multiplicador no aumento da transmissão da giardíase. Além dessas formas de contágio, ainda há a transmissão sexual entre homens homossexuais, especialmente em nações desenvolvidas, como em muitos países da Europa e nos Estados Unidos da América, onde a giardíase já é reconhecida como doença sexualmente transmissível (SHELTON, 2004, ESCOBEDO *et al*, 2014).

Após a ingestão dos cistos, ocorre o processo de “excistação”, em que ele se torna metabolicamente ativo por ser exposto à alta concentração de hidrogênio (H⁺) presente no estômago. Esse processo é finalizado na porção proximal do intestino delgado, auxiliado por proteases pancreáticas como a tripsina e a quimiotripsina, e pelo pH levemente alcalino do duodeno, levando ao rompimento dos pólos do cisto

(AGUILAR-DÍAZ *et al*, 2011) Os flagelos são os primeiros a aparecer quando emergem de um dos pólos abertos no cisto, seguidos do corpo do excizoíto (ADAM, 2001). Excizoíto é o nome dado às formas ovais de trofozoítos encistados com quatro núcleos, sem disco adesivo, que posteriormente divide-se rapidamente originando quatro trofozoítos binucleados (BERNANDER *et al*, 2001). Na luz intestinal, os trofozoítos penetram no muco e aderem nas células epiteliais, não invadindo a mucosa (ECKMANN, 2003). Sobrevivem mediante à absorção de nutrientes presentes, utilizando a glicose, aminoácidos e o colesterol do hospedeiro como fonte de energia (OBERHUBER *et al*, 1997; ANKARKLEV *et al*, 2010; HAN & COLLINS, 2012;).

Já no processo conhecido como encistamento ou encistação, o trofozoíto perde a motilidade. Isso ocorre quando o ambiente intestinal se apresenta agressivo ao trofozoíto, com aumento de bile, pH mais alcalino e redução do colesterol (LAUWAET *et al*, 2007). O trofozoíto torna-se incapaz de aderir ao epitélio intestinal por ter ocorrido fragmentação do disco ventral, internalização dos flagelos e formação de vesículas secretórias específicas para a encistação (LAROCQUE *et al*, 2003; ANKARKLEV *et al*, 2010). Após esse processo há liberação de cistos nas fezes do hospedeiro, contaminando o ambiente, prosseguindo o ciclo (ADAM, 2001; VIEIRA *et al*, 2012).

Grande parte das infecções é assintomática, entretanto, quando sintomática, pode ocasionar alterações no trato gastrointestinal, como cólicas abdominais, flatulência, fezes malcheirosas, diarreia (muitas vezes com duração de várias semanas), e, em casos graves, intolerância à lactose, má absorção de lipídeos e perda de peso (KAPPAGODA *et al*, 2011). Crianças podem sofrer consequências mais graves, como prejuízos no estado nutricional e até mesmo retardo no desenvolvimento físico e cognitivo (BERKMAN *et al*, 2002).

Em alguns casos, a giardíase pode causar atrofia parcial das vilosidades, hiperplasia de criptas (KOOT *et al*, 2009) e disfunção do transporte epitelial e da função de barreira (TROEGER *et al*, 2007). A giardíase é considerada crônica quando não há diagnóstico e/ou tratamento adequado da doença, podendo acarretar absorção de zinco, ferro (DEMIRCI *et al*, 2003), sódio (BURET, 2008), vitaminas lipossolúveis (SAKI *et al*, 2011), vitamina B₁₂ e lipídeos (BANSAL *et al*, 2005) e redução da ação das dissacaridases (SOLAYMANI-MOHAMMADI & SINGER, 2011).

1.2 Tratamento da giardíase

Segundo Watkins & Eckmann (2014), o tratamento da giardíase é realizado principalmente por medicamentos da classe dos nitroimidazóis (metronidazol, tinidazol), 5-nitrotiazol (nitazoxanida), 5-nitrofuranos (furazolidona) e benzimidazóis (albendazol, mebendazol). O esquema de tratamento padrão é a utilização do metronidazol, 250 mg – três vezes ao dia durante três a cinco dias (BASSILY *et al* 1970; BUSATTI *et al.*, 2009; WATKINS & ECKMANN, 2014).

Apesar de bem estabelecido, esse tratamento pode apresentar efeitos colaterais como anorexia, náusea, vômito, diarreia, desconforto abdominal, paladar metálico, boca seca, cefaléia, insônia, vertigem, sonolência e urticária (CUDMORE *et al*, 2004; SOLAYMANI-MOHAMMADI *et al*, 2010). Além desses efeitos, esse medicamento pode gerar em casos raros, pancreatite aguda (O'HALLORAN *et al*, 2010) e encefalopatia (KIM *et al*, 2011).

Na cidade de Hamdan no Irã, foi comparado o efeito terapêutico de albendazol (400 mg, uma vez ao dia por cinco dias) em relação ao metronidazol (250 mg, três vezes por dia por cinco dias) em 120 pacientes com giardíase. Após o tratamento, 10% dos pacientes tratados com albendazol e 23,3% dos tratados com metronidazol ainda apresentavam giardíase. Os pacientes tratados com albendazol relataram menos efeitos colaterais (ALIZADEH *et al*, 2006). Vários estudos compararam o uso de metronidazol e de albendazol no tratamento da giardíase, verificando que ambos apresentam efeitos giardícidias equivalentes. O tratamento com albendazol surtiu menos efeitos colaterais (SOLAYMANI-MOHAMMAD *et al*, 2010), foi mais simplificado (uma vez ao dia por cinco dias) (WATKINS & ECKMANN, 2014) e mais barato (SOLAYMANI-MOHAMMAD *et al*, 2010; GRANADOS *et al*, 2012).

A falha no tratamento da giardíase com nitroimidazóis pode ocorrer em 10-20% dos casos, apesar da eficácia e da alta utilização dessa classe de medicamentos (UPCROFT *ET AL*, 2001; SOLAYMANI-MOHAMMADI *et al*, 2010; TEJMAN-YARDEN *et al*, 2011; GUTIÉRREZ *et al*, 2013). Meltzer *et al* (2014) estudaram sobre a melhor conduta terapêutica para pacientes não-responsivos aos nitroimidazóis e sugeriram que a combinação de albendazol e metronidazol pode ser uma alternativa efetiva. Não há trabalhos recentes sobre a adesão ao tratamento com metronidazol em pacientes com giardíase, mas estudo da década de 80 demonstrou que havia baixa adesão ao tratamento, esquecimento de doses e interrupção precoce (BOREHAM *et al*,

1986). Além disso, em alguns países sabe-se que a qualidade dos medicamentos é pouco analisada e Suleman *et al* (2014) na Etiópia evidenciaram baixa qualidade em relação à dosagem do princípio ativo, dissolução, desintegração de mebendazol, albendazol e tinidazol disponíveis para o tratamento da população, situação preocupante principalmente em lugares com alta prevalência de parasitoses.

1.3 Microbiota e giardiase

Os primeiros estudos que relataram a importância da microbiota intestinal foram realizados há mais de 100 anos (TISSIER, 1900; SAEED *et al*, 1900). TANNOCK & SAVAGE (1974) já descreveram alterações no número de microrganismo de acordo com a porção do trato gastrointestinal, sendo menor no estômago e em maior número e variedade no intestino grosso. Mais recentemente, MOWAT & AGACE (2014) relataram que a região mais bem estudada do intestino é o cólon distal, sendo estimada uma população de microrganismos de 10^9 a 10^{12} em adultos com diversidade de aproximadamente 1100 espécies prevalentes (Figura 1). Na sua totalidade, estima-se que a microbiota intestinal contenha 100 vezes mais genes que o genoma humano (QIN *et al*, 2010; PUTIGNANI *et al*, 2014).

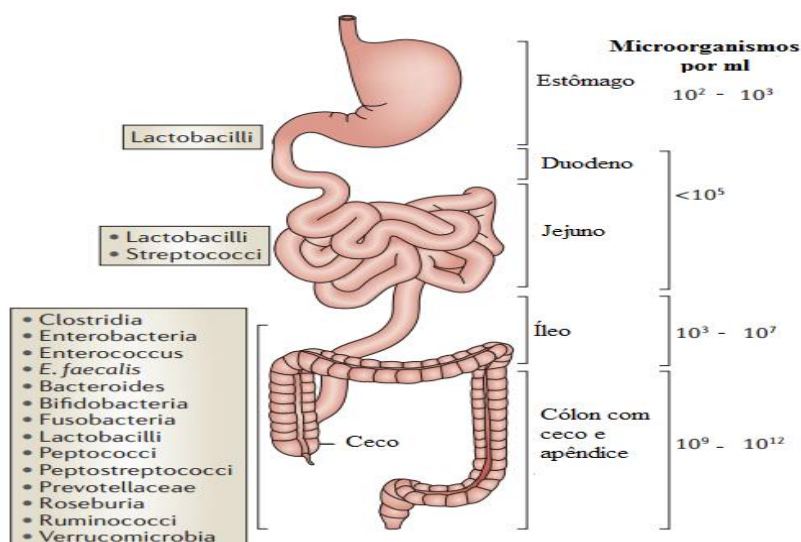


Figura 1: Variações do número e filios de microrganismos de acordo com a localização no trato gastrointestinal. (Fonte: Adaptada de MOWAT & AGACE, 2014).

Alterações quantitativas e qualitativas na microbiota intestinal e/ou mudanças nas atividades metabólicas da microbiota e/ou mudanças no local de distribuição da

microbiota são definidas como disbiose (HAWRELAK & MYERS, 2004). Essas alterações podem ter uma ou várias causas, sendo as principais delas o uso de antibióticos, o consumo alimentar inadequado, as infecções intestinais, o estresse, entre outros. A modulação da disbiose pode ser realizada com tratamento antimicrobiano, probióticos, prebióticos e transplante fecal (WALKER & LAWLEY, 2013).

A microbiota intestinal inicia seu desenvolvimento durante o parto, tanto o vaginal quanto a cesariana. Jakobsson *et al* (2014) avaliaram que nas crianças nascidas por cesariana há menor abundância e diversidade do filo *Bacteroidetes* e menor circulação de quimiocinas associadas à resposta Th1 durante a infância. Outros autores também relataram diferenças no desenvolvimento da microbiota entre os tipos de parto, destacando a baixa diversidade da microbiota intestinal durante o primeiro mês de vida e associação à asma em crianças aos sete anos de idade que nasceram por cesariana (ABRAHAMSSON *et al*, 2014).

Já nas parasitoses intestinais como na giardíase, tem sido proposto ainda que a composição da microbiota é relevante para o estabelecimento da doença. O estudo de TORRES *et al* (1993) foi o primeiro a demonstrar a importância da microbiota intestinal na giardíase, onde os autores demonstraram maior eliminação de cistos de *Giardia* do 9º ao 13º dia de infecção por camundongos isentos de germes comparados aos camundongos convencionais, que tiveram pico entre o 6º e 7º dia. Singer & Nash (2000) compararam camundongos resistentes com camundongos susceptíveis à infecção por *G. lamblia*. Quando ambos os camundongos foram alojados em conjunto, a resistência à infecção foi transferida para os animais que eram susceptíveis e que após o tratamento dos camundongos resistentes com o antibiótico neomicina, as diferenças na susceptibilidade à infecção foram atribuídas à diferenças na composição da microbiota intestinal residente destes camundongos, sugerindo benefício do uso de probióticos para prevenção de infecções com *G. lamblia*.

TORRES *et al*. (2000) demonstraram a ação de estímulo da combinação de componentes microbianos isolados da microbiota duodenal de crianças com giardíase sintomática associada com animais isentos de germes experimentalmente inoculados com cultura axênica de *G. lamblia*. Nenhuma combinação de bactérias conseguiu estimular a patogenicidade nos animais isentos de germes de forma semelhante aos animais convencionais.

PÉREZ *et al* (2001) avaliaram o efeito de sobrenadantes de cultura de diferentes linhagens de lactobacilos sobre o crescimento e adesão de trofozoítos de *Giardia* às células epiteliais intestinais Caco-2 e verificaram que *Lactobacillus johnsonii* La1 inibiu significativamente a proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*, porém nenhuma linhagem influenciou na adesão dos trofozoítos às células epiteliais.

O uso de probióticos como alternativa terapêutica, vem sendo estudado há mais de 20 anos (FULLER, 1989; VASILE *et al*, 2011). Probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL *et al*, 2014), podendo-se destacar a modulação da microbiota intestinal (CAMMAROTA *et al*, 2014). A maior parte dos microrganismos probióticos são bactérias ácido-láticas, gram-positivas, geralmente catalase-negativas, que crescem em microaerofilia (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os probióticos comerciais prontos para consumo devem apresentar a quantidade mínima viável de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária, porém valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. Além disso, deve haver laudo que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (BRASIL, 2002).

Alguns mecanismos de ação dos probióticos são: aumento da competição com patógenos por nutrientes e sítios de adesão (CALLAWAY *et al*, 2008); produção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas (AMER *et al*, 2014); produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) por fermentação de carboidratos, podendo reduzir o pH do cólon que é prejudicial para alguns patógenos (FOOKS & GIBSON, 2002); nutrição dos colonócitos (WONG *et al*, 2006); redução da permeabilidade intestinal (ROSENFELDT *et al*, 2004) além de interação tanto com o sistema imunológico inato e adaptativo, desempenhando um papel crucial na homeostase intestinal (PURCHIARONI *et al*, 2013).

Saccharomyces boulardii é uma levedura não-patogênica isolada pela primeira vez da superfície da fruta lichia em 1923 pelo francês Henri Boulard no sudeste da Ásia, na antiga Indochina (MCFARLAND, 2010). O primeiro artigo que demonstrou as propriedades desse probiótico foi publicado há 33 anos (DUCLUZEAU &

BENSAADA, 1982). Apesar de ser geneticamente semelhante à *S. cerevisiae*, metabolicamente são bastante diferentes, principalmente em relação ao crescimento, resistência à temperatura e à acidez. Além disso, somente *S. boulardii* é comercializada para uso humano (FIETTO *et al.* 2004).

Vários estudos avaliaram o uso e os benefícios de *S. boulardii* em diversas situações, como o restabelecimento da microbiota intestinal após tratamento antibiótico em animais (COLLIGNON *et al.*, 2010), a restituição celular na mucosa intestinal após injúria *in vitro* e em modelos animais (CANONICI *et al.*, 2011), a redução da duração e da frequência de evacuações em crianças hospitalizadas com diarreia (BILLO *et al.*, 2006), a redução dos efeitos colaterais do tratamento contra *Helicobacter pylori* (CREMONINI *et al.*, 2002; MCFARLAND, 2010; SAKARYA *et al.*, 2014; SZAJEWSKA *et al.*, 2015), redução da diarreia associada à antibiótico (SZAJEWSKA *et al.*, 2015), inativação de endotoxinas de *Escherichia coli* em modelo animal (BUTS *et al.*, 2006); melhora da infecção por *Clostridium difficile* (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1996; MCFARLAND, 2006); redução dos sintomas da síndrome do intestino irritável (ABBAS *et al.*, 2014); redução de danos ao fígado em animais com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) (LI *et al.*, 2015); redução da translocação bacteriana em ratos com icterícia obstrutiva (GEYIK *et al.*, 2006); redução de peso, da gordura corporal, da esteatose hepática e do tônus inflamatório em animais *db/db* (EVERARD *et al.*, 2014), estímulo da secreção de IgA (CZERUCKA *et al.*, 2000; BUTS & DE KEYSER, 2006; SOUGIOULTZIS *et al.*, 2006).

O uso desse microorganismo no tratamento de parasitoses em associação com o tratamento convencional tem sido estudado, devido aos efeitos benéficos, como a redução da duração dos sintomas gastrointestinais e da infecção propriamente dita em modelos animais e em humanos (TRAVERS *et al.*, 2011). O uso de *S. boulardii* 250 mg duas vezes ao dia, associado à terapia convencional à base de metronidazol (30 mg/kg duas vezes ao dia) para o tratamento de amebíase foi estudado por DINLEYICI *et al.* (2009) com 50 crianças hospitalizadas, que apresentaram redução da duração da diarreia e aumento da depuração gastrointestinal dos cistos amebianos, em comparação com metronidazol isolado. MANSOUR-GHANAIE *et al.* (2003), em estudo com adultos infectados por *Entamoeba histolytica* e tratados pela co-administração de *S. boulardii* com metronidazol verificaram redução da duração da diarreia, febre e dor abdominal.

A utilização de *S. boulardii* na giardíase foi avaliada por GUILLOT *et al.* (1995) que realizaram um ensaio duplo-cego, no qual a levedura foi administrada a crianças que haviam sido curadas da infecção por *Giardia* com tratamento específico (Tinidazol), mas que continuaram apresentando diarreia (síndrome pós-gastrenterite). Esses autores verificaram que nessa situação, a administração do probiótico, 250 mg duas vezes ao dia durante 30 dias, produziu melhora significativa no quadro clínico e nas avaliações histopatológicas. BESIRBELLIOGLU *et al.* (2006) combinaram o uso de probiótico *S. boulardii* (250 mg duas vezes ao dia por 10 dias) com o tratamento com metronidazol (750 mg três vezes ao dia por 10 dias) em adultos, e verificaram que o tratamento foi efetivo em reduzir a excreção fecal de cistos de *Giardia*, entretanto os mecanismos de ação não foram elucidados. A utilização de leveduras associadas a antibióticos é favorável, pois sua atuação não é afetada por esses medicamentos, além de serem eliminadas rapidamente após a terapia medicamentosa ser interrompida (BODDY *et al.*, 1991; MCFARLAND, 2015).

1.4 Modelo Experimental

Dentre os modelos experimentais propostos para estudar o desenvolvimento e a patogenia da giardíase, os gerbils (*Meriones unguiculatus*) permitem obter bons resultados devido à susceptibilidade da infecção oral, ao tamanho do animal, à facilidade de manipulação e principalmente devido à semelhança entre o padrão da infecção ao comparado com humanos (ECKMANN, 2003, ARAÚJO *et al.*, 2008). É um modelo animal que pode ser utilizado para se analisar o comportamento da infecção e as novas estratégias de intervenção na doença (MOHANTY *et al.*, 2002; CHIRGWIN *et al.*, 2003; HUMEM *et al.*, 2005; TEJMAN-YARDEN *et al.*, 2011; BÉNÉRÉ *et al.*, 2012; VENTURA *et al.*, 2014).

Visto que há escassez de estudos que associem *S. boulardii* ao tratamento e à profilaxia da infecção por *Giardia*, o uso de modelos experimentais que determinem seus efeitos benéficos possibilitará o posterior desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na giardíase.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do probiótico *S. boulardii* em gerbils experimentalmente infectados por *G. lamblia*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a carga parasitária dos animais tratados com probióticos comparados aos não-tratados;
- Avaliar alterações histológicas como altura e largura de vilosidades, altura das criptas intestinais, relação cripta/vilosidade no epitélio intestinal dos animais tratados ou não com *S. boulardii* submetidos à infecção por *G. lamblia*;
- Avaliar o número de células caliciformes por área do intestino delgado de animais tratados ou não com *S. boulardii* submetidos à infecção por *G. lamblia*.
- Avaliar a área de muco por área do intestino delgado de animais tratados ou não com *S. boulardii* submetidos à infecção por *G. lamblia*.
- Avaliar de forma quantitativa os Linfócitos Intraepiteliais no intestino delgado de animais tratados ou não com *S. boulardii* submetidos à infecção por *G. lamblia*.

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Tabela 1. Representação esquemática do delineamento experimental

Dias	Procedimento
-5	Aclimação
0-15	Tratamento com PBS ou probiótico
15	Inoculação dos trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> nos grupos INT e ISB
15-22	Continuidade do tratamento com PBS ou probiótico
22	Eutanásia de todos os grupos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o número: 354/2014. Para a execução do experimento foram utilizados 28 gerbils (*Meriones unguiculatus*), machos, de 4 a 6 semanas, obtidos do Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental (22 dias) em gaiolas coletivas com 7 animais cada, sob controle de temperatura e fotoperíodos de 12h, com livre acesso à água e dieta comercial.

Antes do início do experimento, os animais foram tratados com Ivermectina 1% solução injetável, para assegurar que os mesmos estavam livres de qualquer parasitose. Cada animal recebeu 0,1mL (10µg) da droga por via subcutânea. Foram realizados exames coprológicos dos gerbils através de coletadas fezes de cada animal, durante dois dias alternados, e processadas pelo método de concentração por centrifugação em formol-éter para pesquisa de enteroparasitos, nenhum resultado positivo foi encontrado.

Após aclimação, recebendo ração comercial e água *ad libitum*, os animais foram distribuídos de forma homogênea quanto ao peso corporal em quatro grupos de sete animais cada: Grupo I: Controle tratado com PBS (CT); Grupo II: Infectado tratado com PBS (INT); Grupo III: Controle tratado com *S. boulardii* (SB); Grupo IV:

Infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Posteriormente, o peso corporal e a ingestão alimentar de cada animal foram registrados semanalmente.

A cepa de *S. boulardii* foi fornecida pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do ICB/UFMG, coordenado pelo Professor Dr. Flaviano dos Santos Martins utilizada após isolamento em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Sparks, E.U.A.) da preparação comercial da levedura liofilizada (Floratil, Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Diariamente as culturas foram centrifugadas, o meio de cultura foi retirado e a amostra ressuspensa em PBS para obtenção de 1×10^9 UFC /0,1 mL de *S. boulardii*.

A infecção por *Giardia lamblia* foi realizada utilizando-se trofozoítos da cepa BHRA-93, oriunda do Laboratório de Amebíase da UFMG, onde é mantida em cultura axênica e cultivada em meio TYI-S-33 (DIAMOND *et al*, 1978), suplementado com bile bovina (KEISTER, 1983). A cultura foi mantida pela realização de repiques a cada 72/96 horas, e os tubos armazenados na posição de 30° em estufa bacteriológica sob temperatura de 37°C (HEWLETT *et al*, 1982).

3.1.1 Etapa I – Tratamento pré-infecção

Os animais dos grupos CT e INT receberam 0,1 mL de PBS pH 7,2, enquanto os animais dos grupos SB e ISB receberam 1×10^9 UFC /0,1 mL de *S. boulardii* em suspensão de PBS, uma vez ao dia, durante 15 dias consecutivos por meio de gavagem, mesma quantidade de probiótico utilizado em trabalhos anteriores com o mesmo microrganismo (GENEROSO *et al*, 2011; MAIOLI *et al.*, 2014; MARTINS *et al*, 2013).

3.1.2 Etapa II – Ajuste do inóculo e infecção

Após 15 dias de tratamento, os animais dos grupos INT e ISB foram infectados com *Giardia lamblia*. Tubos de cultura contendo trofozoítos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos para que ocorresse o desprendimento dos parasitos da parede dos tubos. Após este período, 25 µL do meio de cultura foram adicionados a um microtubo contendo 75 µL de corante vital (eosina 0,125%). Após homogeneização, a solução foi colocada na câmara de Neubauer para contagem, considerando-se apenas os

quatro maiores quadrantes. A concentração obtida foi diluída em meio de cultura, livre de trofozoítos, obtendo-se a concentração final de 1×10^6 trofozoítos/mL. Este inoculo, já foi determinado no laboratório como suficiente para produzir infecção em 100% dos animais experimentados (VENTURA *et al.*, 2014). Os animais foram inoculados por gavagem, com o auxílio de uma cânula DELVO nº 15, acoplada a uma seringa de 1 mL.

3.1.3. Etapa III - Tratamento pós-infecção

Após a infecção, os animais dos grupos INT e ISB continuaram recebendo, respectivamente 0,1 mL de PBS e 1×10^9 probióticos/0,1 mL de PBS uma vez ao dia, por meio de gavagem, até o dia da eutanásia. Os animais dos grupos CT e SB não foram infectados e continuaram recebendo da mesma forma, 0,1 mL de PBS e 1×10^9 probióticos/0,1 mL de PBS respectivamente.

3.2. Eutanásia dos animais e coleta de materiais

No 22º dia de experimento (sete dias de infecção), após jejum de 12h, os animais foram anestesiados, com injeção intraperitoneal contendo solução de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e logo após realizada a abertura da cavidade peritoneal com incisão mediana, para a localização das vísceras. A porção proximal do intestino delgado (aproximadamente 4 cm) foi retirada, aberta longitudinalmente para produção de cortes histológicos. Na porção média e distal, foi realizada a contagem de trofozoítos de *Giardia* aderidos ao epitélio (VENTURA *et al.*, 2014).

3.3. Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal

Após a eutanásia, o tecido intestinal foi submetido a processamento para análise histopatológica e morfométrica (CALIARI, 1997). Inicialmente, a porção proximal do intestino delgado (± 4 cm) foi aberta longitudinalmente, colocada sobre uma superfície plana e enrolado em uma espiral com a luz Intestinal voltada para dentro, de modo a formar rolos (rocambos) com a porção duodenal. Os fragmentos enrolados em forma de rocambos e amarrados com linha de costura foram fixados por imersão em solução Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos. Em seguida os rolos amarrados foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% pH 7,2 por 24

horas. Após o período de fixação, todos os fragmentos coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina, para obtenção de cortes com 4µm de espessura. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foram feitas reações imunohistoquímicas para identificação de trofozoítos de *G. lamblia*.

Todos os cortes histológicos da porção proximal do intestino delgado corados com H&E foram visualizados pela objetiva de 10x do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) para a digitalização aleatória de 30 vilosidades intestinais por meio da microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan). A altura das vilosidades e das criptas, além da largura das vilosidades foram calculadas através do software ImageJ. A base das vilosidades e das criptas e a lateral de cada vilosidade foram delimitadas manualmente através de ferramentas do software, todos os pixels da vilosidade foram selecionados para criação de uma imagem binária e a altura foi calculada automaticamente (CALIARI, 1997). Foi realizado posteriormente um cálculo de razão entre o valor de profundidade de cripta / altura de vilosidade (ROBERTS-THOMSON *et al* 1976)

Foram realizadas as análises de contagem de linfócitos intraepiteliais - LIE's (HAYAT *et al*, 2002; DENG *et al*, 2012) e de contagem de células caliciformes e de células epiteliais (THOMPSON & APPLGATE, 2006; DENG *et al*, 2012) à partir das lâminas anteriormente produzidas em coloração de H&E ou PAS, para cada campo ou sessão (cinco sessões por animal). A média das sessões foi calculada e os resultados foram expressos em número de LIE's por 100 células epiteliais ou em número de células caliciformes por 100 células epiteliais.

Para o cálculo da área ocupada por muco nas vilosidades intestinais foram digitalizadas 30 imagens dos cortes histológicos corados com PAS, visualizadas pela objetiva de 40X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany). Todos os pixels com tons de bonina das regiões PAS⁺ foram selecionados para a criação de uma imagem binária e para a obtenção da área de muco em µm² (CALIARI, 1997).

3.4. Contagem de trofozoítos de *G. lamblia* aderidos ao epitélio intestinal

A contagem de trofozoítos aderidos à mucosa foi realizada na porção média e distal do intestino delgado. Logo após o sacrifício, o tecido foi macerado e depositado em frasco rosqueado, com capacidade de 15 mL, contendo 6 mL de PBS (pH 7,0-7,2) a

4°C por aproximadamente 15 minutos. Após esse período, o frasco foi centrifugado por 10 minutos a 2500 RPM, objetivando a concentração dos trofozoítos. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com auxílio de pipeta de transferência, deixando o volume de 2mL de PBS. A quantificação do número de trofozoítos foi realizada mediante contagem de duas amostras de 0,1 mL de sedimento em câmara de Newbauer (BELOSEVIC, 1983; ARAÚJO *et al*, 2008).

3.5. Reação imunohistoquímica e análise quantitativa de trofozoítos

A técnica para processamento em imunohistoquímica foi padronizada em trabalho conjunto dos Laboratórios de Amebíase e Protozoários Intestinais/Depto Parasitologia (LAPI) e de Protozooses/Depto Patologia Geral e foi descrita em detalhes no trabalho de VENTURA *et al* (2013). Os cortes foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 40vv a 0,2% em 200 ml de PBS por 20 minutos. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando-se os cortes com soro de cabra diluído a 1:40 por 40 minutos. As lâminas foram incubadas com soro policlonal anti-*G. lamblia* diluído a 1:1000 (produzido no LAPI), em seguida, incubados com IgG biotinizada diluída a 1:50 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) a 1:100. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos obtidos de lesões ricas em *Giardia* de animais experimentalmente infectados. Como controle negativo, o 1º antisoro foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris concentrada por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan.

Após a reação, toda a superfície mucosa da porção proximal do intestino delgado foi visualizada através da objetiva de 10X e digitalizada por meio da mesma microcâmera. Todos os pixels com tons de marrom dos trofozoítos marcados pela imunohistoquímica foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área total de marcação. Processamento digital e recursos do software KS300 foram utilizados para eliminar artefatos.

3.6. Análise Estatística dos Dados

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os testes utilizados foram o teste de Grubbs para detecção de outliers, Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das variáveis. Para comparação entre os grupos experimentais, foi utilizado teste *t*- Student, para análise da contagem de trofozoítos aderidos no epitélio intestinal ou imunomarcados entre os grupos INT e ISB. Para as outras análises foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. Todos os dados apresentados apresentaram distribuição simétrica ou normal. Foi considerado nível de significância de 5%. Todos os testes e análises foram realizados no software Prisma (GraphPad Prism Software, San Diego California – USA), versão 6.0.

Resultados

4. RESULTADOS

A ingestão alimentar e o ganho de peso foram semelhantes entre os quatro grupos (CT, INT, SB e ISB) durante todo o período experimental. Em relação à carga parasitária, a Figura 2 apresenta a contagem direta de trofozoítos aderidos ao epitélio e a área de trofozoítos imunomarcados dos animais do intestino delgado dos grupos CT, INT, SB e ISB, após o período experimental (22 dias).

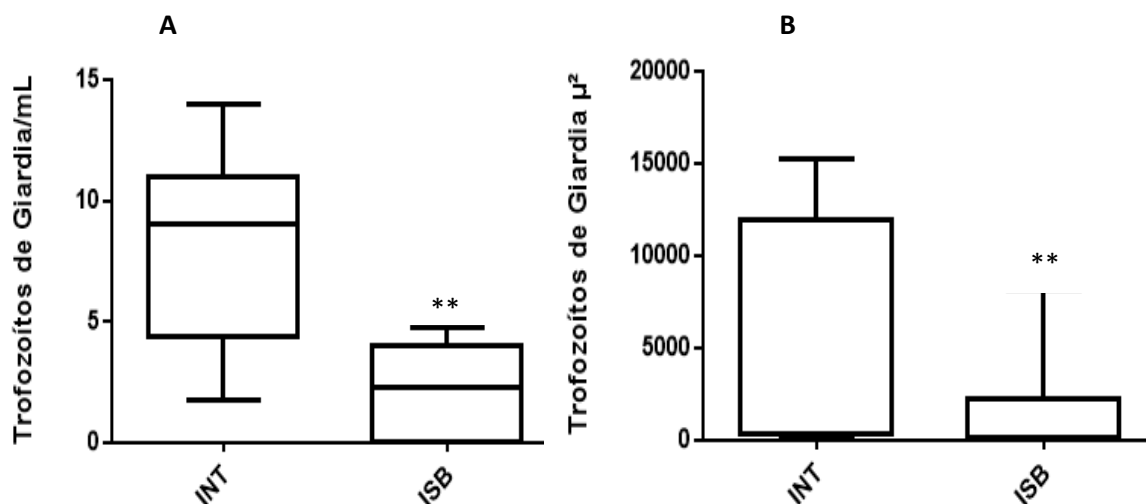


Figura 2: Carga parasitária dos gerbils infectados com *G. lamblia* tratados ou não com *S. boulardii*

Grupos Infectado tratado com PBS (INT) e Infectado tratado com *S. boulardii* (ISB) A) Contagem direta de trofozoítos aderidos no epitélio do intestino delgado, B) área de trofozoítos imunomarcados no intestino delgado. Teste T (**p <0,01). Dados expressos como média, barras de erros mostram o desvio padrão

A administração de *S. boulardii* reduziu o número de trofozoítos no intestino dos animais infectados com *G. lamblia* (grupo ISB - $2,21 \pm 1,85 \times 10^5$) em relação aos animais infectados não tratados (grupo INT - $8,17 \pm 4,22 \times 10^5$) ($p < 0,01$) como mostra a Figura 2A. Já a Figura 2B mostra a redução da área de trofozoítos imunomarcados no lúmen e/ou aderidos nas vilosidades intestinais dos animais do grupo ISB ($1480,49 \pm 3291,42 \mu\text{m}^2$) em relação aos animais do grupo INT ($4963,27 \pm 6776,08 \mu\text{m}^2$).

A dados da Figura 2 confirmam os achados da Figura 3, onde podemos observar um menor número de trofozoítos marcados nos cortes histológicos nos animais submetidos ao tratamento com o probiótico.

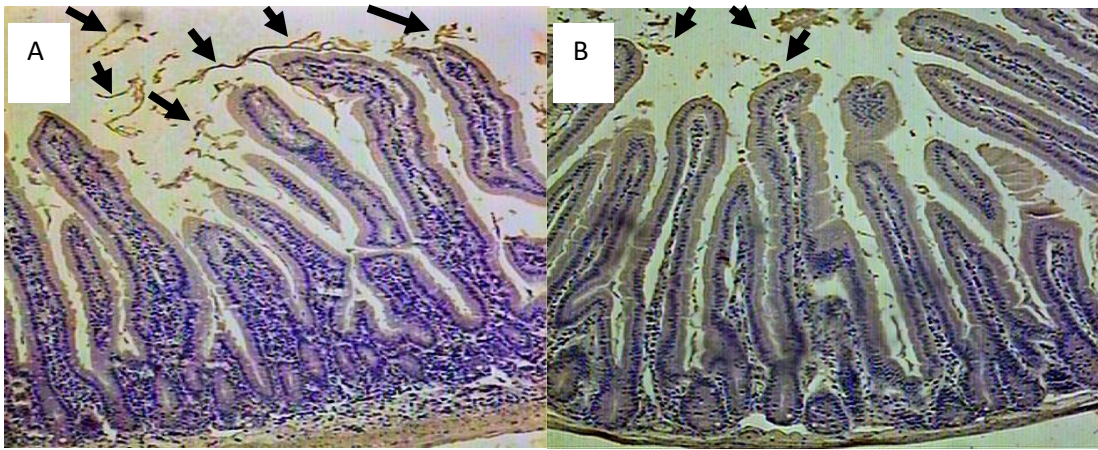


Figura 3: Fotomicrografia de imunohistoquímica para trofozoítos de *G. lamblia*.

A) Grupos Infectado tratado com PBS (INT) e (B) Infectado tratado com *S. bouardii* (ISB). Trofozoítos positivos aderidos às vilosidades (cabeças de seta). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris e objetiva de 10X.

A Figura 4 apresenta as análises morfométricas no intestino delgado. Foram analisados altura das vilosidades e das criptas, relação entre criptas e vilosidades e largura de vilosidades.

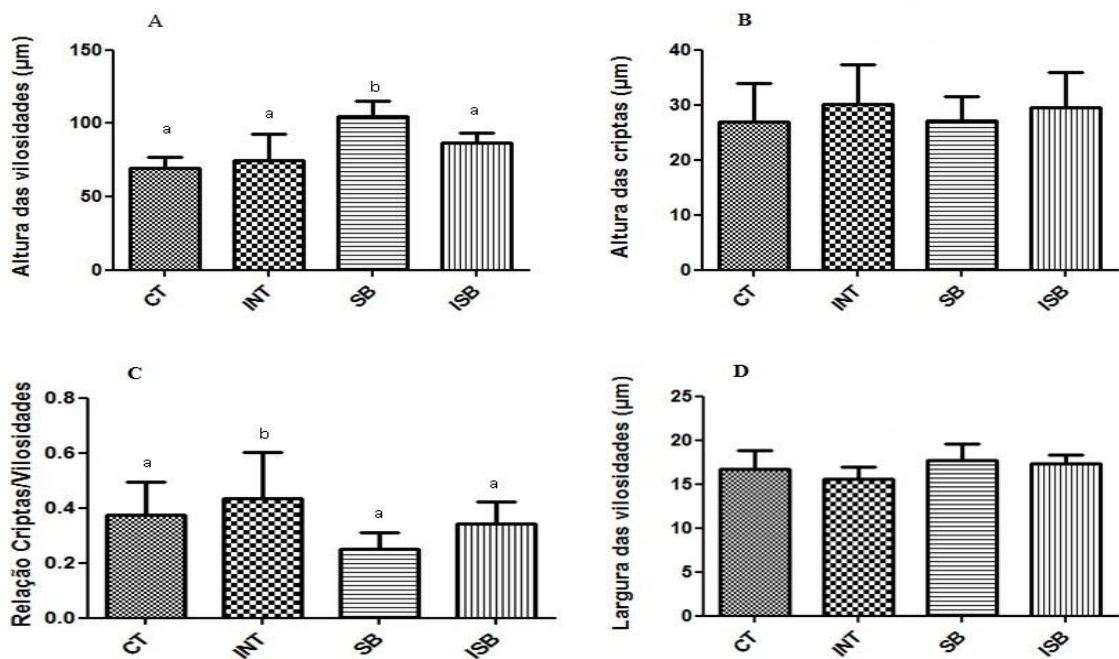


Figura 4. Análises morfométricas no intestino delgado de gerbils

Grupos Controle tratado com PBS (CT); Infectado tratado com PBS (INT); Controle tratado com *S. bouardii* (SB); Infectado tratado com *S. bouardii* (ISB). A) média da altura de vilosidade (µm), B) média da altura das criptas (µm), C) relação entre criptas/vilosidades (µm), D) média da largura das vilosidades (µm). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste ANOVA seguido de Tukey. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

O tratamento com *S. boulardii* no grupo SB levou ao aumento das vilosidades intestinais dos animais em relação aos demais grupos, ou seja, a infecção não alterou esse parâmetro como fica claro na Figura 4A. Já a Figura 4B apresenta a altura das criptas intestinais dos grupos experimentais. Os resultados mostram que não houve diferença entre os grupos infectados ou não e também entre os tratados com probiótico ou não.

A Figura 4C apresenta a relação entre a altura das criptas /altura das vilosidades intestinais dos animais dos grupos CT, INT, ISB e SB após o período experimental. Os animais do grupo INT apresentaram maiores valores, comparados aos animais dos demais grupos. A Figura 4D apresenta a largura das vilosidades intestinais dos grupos experimentais. Os resultados mostram que não houve diferença entre os grupos independente de infecção ou tratado associado. Todos os resultados mostrados na Figura 4 podem ser visualizados com mais detalhes na figura 5.

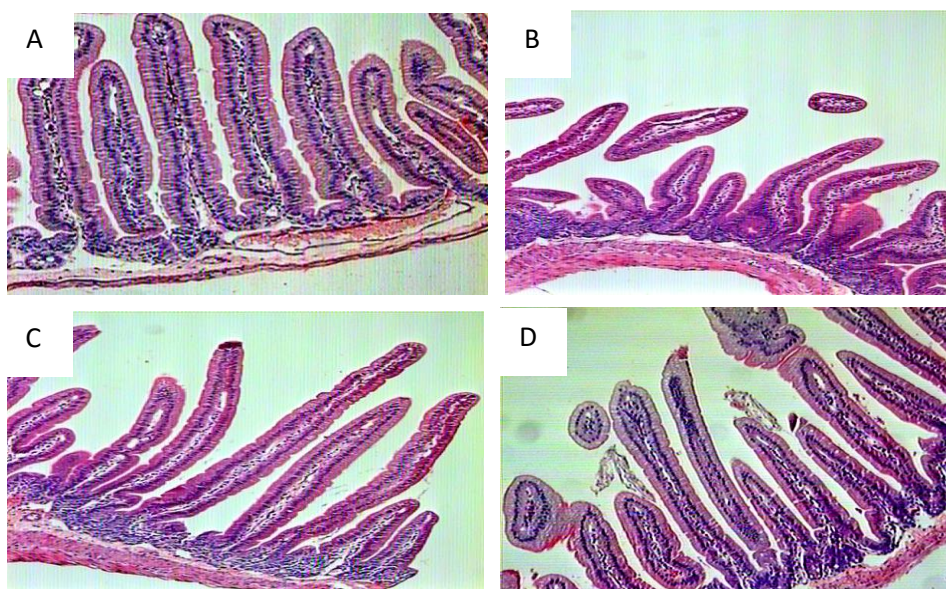


Figura 5: Fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração de H&E.

A) Grupos Controle tratado com PBS (CT); B) infectado tratado com PBS (INT); C) Controle tratado com *S. boulardii* (SB); D) infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Demonstrando a morfometria da porção proximal do intestino delgado de gerbils com coloração H&E e objetiva de 10X.

A Figura 6 apresenta a área de produção de muco nas vilosidades intestinais dos animais dos diferentes grupos. Os animais tratados com *S. boulardii* tiveram maior produção de muco que os animais não tratados (grupo SB apresentaram $111.595 \pm 10.266 \mu\text{m}^2$ e grupo ISB $103.679 \pm 4.643 \mu\text{m}^2$ x grupo CT com $81.655 \pm 14,681 \mu\text{m}^2$ e grupo INT $73.478,62 \pm 16.378 \mu\text{m}^2$, $p < 0,01$).

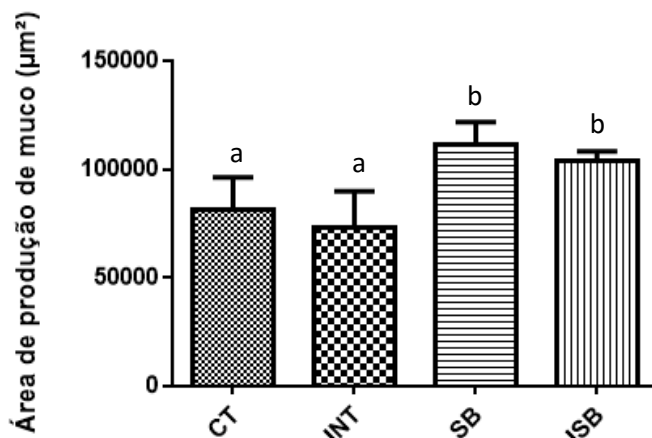


Figura 7. Área de produção de muco em μm^2

Grupos Controle tratado com PBS (CT); Infectado tratado com PBS (INT); Controle tratado com *S. boulardii* (SB); Infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Teste ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,01$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

O número de células caliciformes em 100 células epiteliais, ou seja, o percentual (%) é apresentado na Figura 8. Os animais do grupo INT tiveram menor percentual de células caliciformes ($9,52 \pm 1,39\%$) quando comparados aos demais grupos ($p < 0,01$).

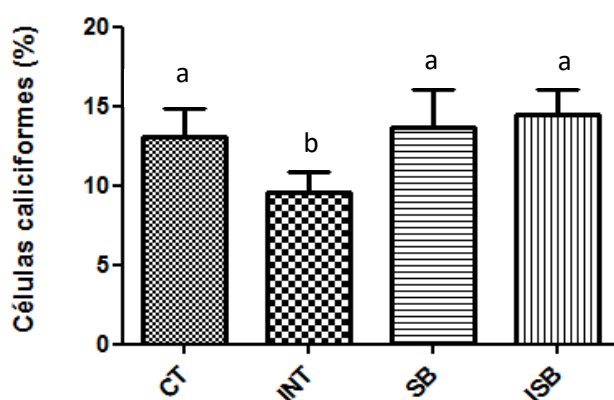


Figura 8. Contagem de células caliciformes/100 células epiteliais na mucosa duodenal

Grupos Controle tratado com PBS (CT); Infectado tratado com PBS (INT); Controle tratado com *S. boulardii* (SB); Infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Teste ANOVA seguido de Tukey. $p < 0,01$ ao comparar o grupo INT com o grupo SB. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

A Figura 9 mostra a fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração PAS. Os resultados mostram que há presença de maior área PAS positiva e a maior número de células caliciformes nos grupos CT, ISB e SB em comparação ao grupo INT..

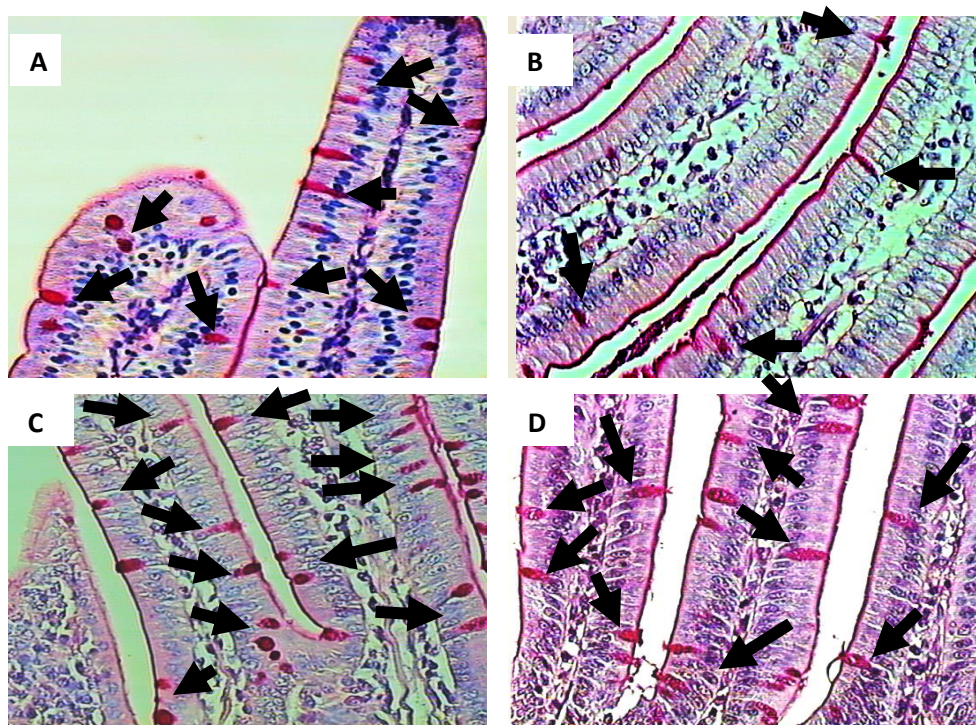


Figura 9: Fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração de PAS e objetiva de 10X.

A) Grupos Controle tratado com PBS (CT); B) infectado tratado com PBS (INT); C) Controle tratado com *S. bouvardii* (SB); D) infectado tratado com *S. bouvardii* (ISB). Demonstrando a morfometria da porção proximal do intestino delgado de gerbils com coloração PAS e objetiva de 40X, destacando células caliciformes (cabecãs de setas).

A Figura 10 representa a contagem de linfócitos intraepiteliais por 100 células epiteliais. Os resultados mostram que a infecção com *G. lamblia* (grupo INT) apresentou aumento do percentual de linfócitos/células epiteliais em relação ao grupo CT. O percentual de LIE mostrou-se ainda maior com o tratamento com *S. bouvardii* (Grupos SB e ISB).

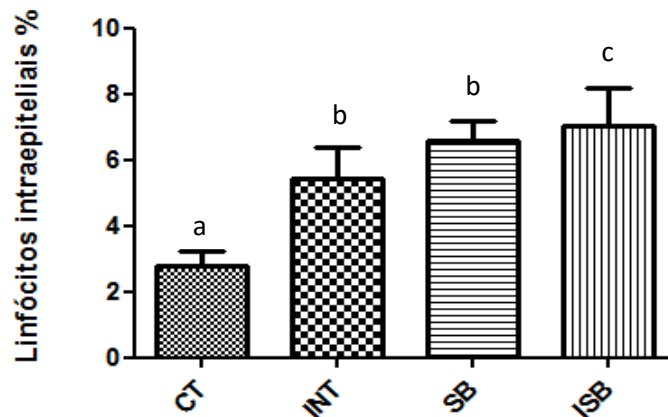


Figura 10. Contagem de Linfócitos intraepiteliais (LIE's) /100 células epiteliais

Grupos Controle tratado com PBS (CT); Infectado tratado com PBS (INT); Controle tratado com *S. boulardii* (SB); Infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Teste ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,01$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Semelhante ao exibido anteriormente, na Figura 11, podemos observar o infiltrado de linfócitos nos diferentes grupos experimentais. Grupo CT (A) escassa quantidade de linfócitos intraepiteliais. Grupos INT (B), SB (C) e ISB (D) abundância de linfócitos intraepiteliais.

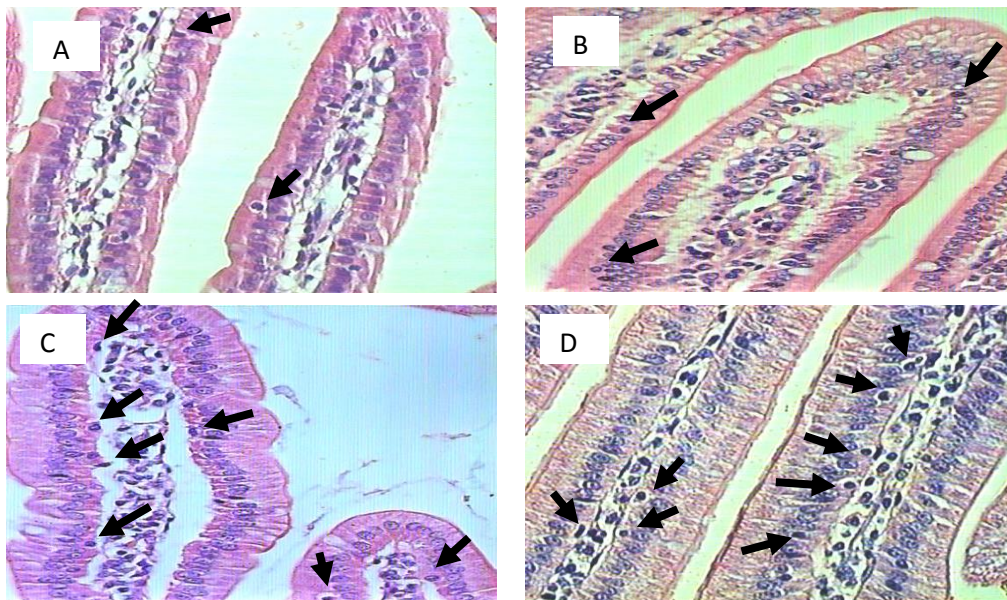


Figura 11. Fotomicrografia da porção proximal do intestino delgado com coloração de H&E objetiva de 40X:

A) Grupos Controle tratado com PBS (CT); B) infectado tratado com PBS (INT); C) Controle tratado com *S. boulardii* (SB); D) infectado tratado com *S. boulardii* (ISB). Demonstrando a morfometria da porção proximal do intestino delgado de gerbils com coloração HE& e objetiva de 40X, destacando linfócitos intraepiteliais (cabeças de setas).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O nosso estudo evidenciou a redução da carga parasitária em gerbils infectados com *G. lamblia* tratados com o probiótico *S. boulardii* (grupo ISB) em comparação com os animais infectados tratados com PBS (grupo INT). Associado a este achado, foi encontrado aumento da produção de muco e de LIE's no grupo ISB. Não foram encontradas diferenças entre altura e largura de vilosidade e altura de criptas.

Confirmando a redução da carga parasitária com o tratamento probiótico por nós observada, através da contagem dos trofozoítos aderidos, apresentamos a contagem dos trofozoítos imunomarcados. Qualitativamente e quantitativamente, observamos menor número de trofozoítos imunomarcados nos cortes histológicos, sustentando a atividade probiótica do *S. boulardii* em giardíase.

O tratamento preventivo ou posterior à infecção por *Giardia lamblia* com probióticos vem sendo avaliado por alguns autores, com diferentes cepas de probióticos e em sua grande maioria com resultados promissores em relação à redução da carga parasitária. Um destes estudos foi o de HUMEN *et al* (2005), utilizando gerbils como modelo experimental, que observaram que a administração de 1×10^8 UFC de *Lactobacillus johnsonii* La1, sete dias antes da inoculação de trofozoítos de *Giardia*, reduziu a contagem de trofozoítos intestinais e levou à resolução da infecção em 14 dias, com maior atividade da enzima sacarase e menor dano histológico da mucosa intestinal, quando comparado com o grupo controle. BENYACOUB *et al* (2005) realizaram ensaios em que 1×10^9 UFC de *Enterococcus faecium* SF68 foram administradas em camundongos infectados com *Giardia* e verificaram que houve redução do número de trofozoítos intestinais e da quantidade de antígenos de *Giardia*.

SHUKLA *et al* (2008), em estudo com camundongos BALB/C utilizando 1×10^9 UFC de *Lactobacillus casei casei* (MTCC 1423) por sete dias como tratamento preventivo da giardíase, também observaram redução no número de trofozoítos no intestino delgado destes animais, tanto em três quanto em sete dias após a infecção. Os mesmos pesquisadores, ao utilizarem *L. acidophilus* sete dias antes da infecção por *Giardia lamblia* no mesmo modelo animal, encontraram redução da excreção fecal de cistos e resolução da infecção após 21 dias (SHUKLA *et al* 2010a). No mesmo ano, estes autores observaram que a utilização de 1×10^9 UFC dos probióticos *L. casei* ou *L. yoghurt*, do primeiro ao 30º. dia após a infecção com *G. lamblia* em camundongos

BALB/C, reduziu a contagem de trofozoítos no intestino delgado dos animais (SHUKLA *et al* 2010b).

No presente trabalho não foi observada diminuição na altura de vilosidades dos animais dos grupos infectados (INT e ISB). A intensa ligação entre o parasito e a superfície intestinal do hospedeiro pode desencadear diversas alterações no organismo, que acarretarão apoptose de enterócitos e, dependendo da cepa do parasito, atrofia das vilosidades intestinais (CHIN *et al*, 2002). Em modelo experimental, CEVALLOS *et al* (1995) observaram a atrofia de vilosidades somente no 6°. dia de infecção, sendo que a partir do 7°. até o 30°. dia não foi mais observada essa alteração em ratos infectados com 5×10^5 trofozoítos. Talvez não tenhamos observado atrofia das vilosidades devido ao tempo de observação. Eutanasiámos nossos animais no 7° dia pós infecção devido ao pico de infecção anteriormente relatado. Corroborando com nossos achados, SCOTT *et al.*, (2000) ao estudarem a morfologia intestinal de camundongos após seis dias de infecção com 1×10^6 trofozoítos, não encontraram alterações nas vilosidades. Em estudos anteriores do nosso laboratório que também utilizaram gerbils como modelo experimental e o mesmo tempo de infecção, os achados foram semelhantes, sem alteração nas vilosidades intestinais (VENTURA *et al.* 2013; FONSECA, 2015).

Já o tratamento com *S. boulardii* em animais não infectados (grupo SB) resultou em aumento da altura das vilosidades, demonstrando os benefícios do uso desse probiótico em animais saudáveis. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por GEYIK *et al*, 2006 e ALDEMIR *et al*, 2002, que administraram *S. boulardii* a ratos adultos (100 mg/dia) e (800 mg/kg/dia), respectivamente, ambos observaram melhora da arquitetura intestinal em ambos os modelos.

Ainda sobre a morfometria intestinal não foram verificadas diferenças da altura das criptas intestinais entre os grupos. Esperava-se aumento da altura das criptas nos animais infectados, já que as células-tronco intestinais localizadas nas criptas do delgado dão origem às células de Paneth, aos enterócitos e às células caliciformes (SIMON-ASSMANN *et al.*, 2007). Após a diferenciação, as células de Paneth permanecem nas criptas, enquanto as outras células se deslocam para as vilosidades. Apesar do aumento da altura das criptas intestinais ser direcionado para regenerar as vilosidades, muitas vezes o processo de apoptose é tão mais intenso, que a hiperplasia criptal servirá apenas para atenuar a degeneração celular (BURET, 2007).

Alguns estudos encontraram aumento no tamanho das criptas em modelos animais infectados como FONSECA (2015) que trabalhou com gerbils, BARTELT *et al*, 2013, que utilizaram camundongos C57BL/6 e MAHMOUD *et al*, 2014, que infectaram ratos albinos. Por outro lado, CEVALLOS *et al* (1995) não encontraram diferenças na altura das criptas intestinais em ratos com giardíase. Os resultados de trabalhos clínicos confirmam que a infecção por *G. lamblia* não altera a altura das criptas. O trabalho de TROEGER *et al* (2007) ao analisar 13 pacientes sintomáticos com giardíase crônica não encontrou diferenças na altura das criptas. Já KOOT *et al* (2009) que avaliaram biópsias duodenais de 32 crianças com giardíase na Holanda, observaram apenas em quatro discreta hiperplasia de criptas.

A relação entre criptas e vilosidades pode estar aumentada quando há hiperplasia destas últimas (SCOTT *et al*, 2004; ARAÚJO *et al*, 2008; ANKARKLEV *et al*, 2010). Entretanto, como não encontramos hiperplasia de criptas, não houve alterações significativas nessa razão nos animais infectados. Como a altura das vilosidades dos animais não infectados tratados com *S. boulardii* (grupo SB) foi maior, conseqüentemente houve redução da razão altura das criptas/altura das vilosidades em relação ao grupo de animais infectados não tratados com *G. lamblia* (INT).

O intestino de humanos e roedores é coberto por um importante componente que forma gel viscoso, conhecido como muco (ATUMA *et al*, 2001). O muco possui funções protetoras para mucosas, funcionando como barreira física e química (SCALDAFERRI *et al.*, 2012). A composição dessa barreira é principalmente de mucinas, que são glicoproteínas secretadas pelas células caliciformes (JOHANSSON & HANSSON, 2013). A camada de muco permite que haja separação entre as células epiteliais e patógenos que chegam ao intestino, evitando infecções e inflamações exacerbadas (HANSSON, 2012).

A microbiota nesse sentido pode influenciar a produção de muco através da atuação das células caliciformes, como descrito por KANDORI *et al* (1996), que identificaram a importância da microbiota intestinal tanto no tamanho quanto na quantidade de células caliciformes, visto que essas células estavam em menor número e tamanho nos animais *germ free* comparados com animais convencionais. O aumento da produção de muco após a administração de probióticos já foi verificado em animais com

estado nutricional comprometido. Na desnutrição, o uso de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus helveticus* levou à rápida restauração da quantidade de células caliciformes na mucosa de animais desnutridos experimentalmente em comparação com animais desnutridos que não receberam tratamento com probióticos (DOCK-NASCIMENTO *et al*, 2007).

Em estudo com animais desnutridos induzidos por dieta hipoprotéica e infectados com *G. lamblia* SHUKLA *et al* (2012) demonstraram a restauração do número de células caliciformes em animais tratados com *Lactobacillus casei* MTCC 1423. Em relação à produção de muco em animais infectados, AMAT *et al* (2015) demonstraram que a giardíase pode causar depleção de mucinas nas células caliciformes no intestino delgado e no cólon, o que facilitaria a translocação bacteriana.

No presente trabalho, foi possível observar que os animais tratados preventivamente por 15 dias com o probiótico *S. boulardii*, mesmo tempo utilizado por SOYTURK *et al* (2012) em modelo de prevenção contra colite, tiveram aumento da área de produção de muco e da contagem de células caliciformes. O aumento da expressão de mucinas nas células caliciformes induzido por probióticos já foi verificado em outras patologias (MACK *et al*, 2003). Na infecção por *Giardia lamblia*, ROSKENS & ERLANDSEN (2002) sugerem que a inibição da ligação de trofozoítos na mucosa intestinal, é desencadeada pela maior produção de mucina. LEITCH *et al* (1989) alegaram que o aumento da secreção de muco reduziria a estabilização dos trofozoítos no epitélio intestinal, exercendo papel protetor contra a infecção. Assim, considerando que a giardíase levou à diminuição da produção de muco no modelo estudado, podemos especular que a diminuição da carga parasitária observada nos animais tratados com *S. boulardii* esteja relacionada à maior produção de muco induzida pelo probiótico. Os mecanismos de aumento da produção de muco frente a uma infecção precisam ser elucidados, mas parecem estar associados ao aumento da expressão de glicoproteínas. Em estudos utilizando *L. rhamnosus* GG foi possível observar que os agentes probióticos inibiram a aderência de *Escherichia coli* enteropatogênica *in vitro* através da capacidade de aumento da expressão de MUC2 e MUC3 (MACK *et al*, 1999). Em 2003, MACK *et al* ao trabalharem com cepas de *Lactobacillus*, verificaram a indução de transcrição e de tradução da mucina MUC3 e sua posterior secreção. Resultados semelhantes foram encontrados por CABALLERO-FRANCO *et al* (2006) ao estudarem

uma fórmula probiótica contendo grupos bacterianos *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* e *Streptococci*. Foi observado aumento da produção de muco *in vivo* induzido por estimulação da secreção de mucina e por maior expressão do gene MUC 2. Além disso, HAFEZ (2012) verificou que o probiótico *Escherichia coli* (Nissle 1917) também possui potencial em induzir a secreção dos genes MUC2, MUC3, MUC5AC e MUC5A por células epiteliais do intestino. Outra via de ação que foi proposta em estudo de MCCLEMENS *et al* (2010) após administração de *Lactobacillus reuteri* em animais infectados por *Trichuris muris*, foi o aumento da produção de muco por células caliciformes, possivelmente por mecanismo mediado por IL-10.

Além da produção de muco, os probióticos podem exercer função de barreira física, através do princípio de exclusão competitiva, que envolve adição de organismos não-patogênicos de uma ou de múltiplas espécies ao trato gastrointestinal, a fim de reduzir a população patogênica (CALLAWAY *et al*, 2008). Outros possíveis modos de ação da exclusão competitiva incluem: (1) a concorrência direta e indireta de nutrientes, (2) a competição por pontos de ligação física, (3) a produção de compostos antimicrobianos (incluindo ácidos graxos voláteis), (4) aumento da atividade do sistema imune do hospedeiro, e (5) uma interação sinérgica de duas ou mais das atividades acima (LLOYD *et al.*, 1974). Todos esses mecanismos podem atuar de maneira maior ou menor dependendo da cepa e da dose utilizada.

O último parâmetro avaliado no nosso trabalho foi a contagem de LIE's, que foi aumentada nos grupos INT e SB e ainda mais aumentada no grupo ISB. Esses linfócitos residentes são células T com capacidade imunoreguladora e de manutenção da integridade do epitélio (HAYDAY *et al*, 2001). Os LIE's são observados no epitélio de revestimento da superfície intestinal, especialmente no intestino delgado (GOTO *et al*, 2000). A infecção por *G. lamblia* em camundongos associada com o aumento de LIE's foi relatada também por VINAYAK *et al.* (1991) e SCOTT *et al*, 2004. Em estudos clínicos como o de ARÉVALO *et al* (2009) que avaliaram 30 pacientes e encontraram aumento do número de linfócitos intraepiteliais em 63,3% dos casos o de TROEGER *et al* (2007) que analisaram 13 pacientes sintomáticos com giardíase crônica e encontraram aumento 2,7 vezes o número de LIE em comparação com os indivíduos do grupo controle.

A relação entre microbiota e LIE's foi estudada inicialmente em animais *germ-free*, que apresentam menor número dessas células e conseqüentemente atividade citotóxica comprometida (IMAOKA *et al*, 1996; UMESAKI *et al*, 1993). JIANG *et al* (2013) verificaram que o reconhecimento da microbiota intestinal pelo NOD2 (Domínio de ligação da oligomerização de nucleótidos 2) é importante para manter a homeostase de LIE's. Na ausência de NOD2, a microbiota intestinal exerce uma forte estimulação das Placas de Peyer com aumento da proporção de células T CD4+, de citocinas pró-inflamatórias, além de maiores taxas de permeabilidade para os antígenos (BARREAU *et al*, 2010).

A relação entre LIE's e o uso de probióticos foi avaliada por RIEGER *et al* (2015) que encontraram aumento dos mesmos após administração do probiótico *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 em animais infectados com *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT 104 e. No caso de colite experimental, o uso de uma mistura de probióticos com cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também aumentou o número de LIE's (ROSELLI *et al*, 2009). Especificamente em relação ao uso de *S. boulardii*, foi verificado aumento de LIE's em pacientes com síndrome do intestino irritável tratados com 750 mg/dia por 6 meses (ABBAS *et al*, 2014).

Diante do exposto, podemos anunciar a influência do probiótico *S. boulardii* na giardíase, o que referencia o estudo de diferentes cepas buscando uma melhor atividade. Neste contexto, apresentamos um probiótico promissor: *S. boulardii*, que mostrou ótimas taxas de redução da carga parasitária com aumento de produção de muco. Estes resultados estimulam novos estudos, tanto para definir detalhadamente seu mecanismo de ação como para avaliar seu potencial terapêutico.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

É possível concluir que o uso do probiótico *S. boulardii* por 15 dias de forma preventiva na giardíase é efetivo, sendo que o aumento da produção de muco e da contagem de linfócitos intraepiteliais possam constituir alguns dos mecanismos usados pelo probiótico na redução da carga parasitária. As perspectivas são para o uso de *S. boulardii* no tratamento adjuvante ao tratamento convencional visando reduzir efeitos colaterais e garantir maior eficácia.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBAS, Zaigham *et al.* Cytokine and clinical response to *Saccharomyces boulardii* therapy in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized trial. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 26, n. 6, p. 630-639, 2014.

ABHYANKAR, Mayuresh M. *et al.* The Entamoeba histolytica serum-inducible transmembrane kinase EhTMKB1-9 is involved in intestinal amebiasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 243-248, 2012.

ABRAHAMSSON, T. R. *et al.* Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 44, n. 6, p. 842-850, 2014.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**; v. 14, n. 3, p. 447–475, 2001.

AGUILAR-DÍAZ H, CARRERO JC, ARGÜELLO-GARCIA R, LACLETTE JP, MORALES-MONTOR J. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? **Trends in Parasitology**. 27(10): 450-458, 2011.

AKLILU *et al.* Prevalence of intestinal parasites, salmonella and shigella among apparently health food handlers of Addis Ababa University student's cafeteria, Addis Ababa, Ethiopia **BMC Research Notes** v. 8, n.17, 2015.

ALDEMIR, MUSTAFA *et al.* Effects of octreotide acetate and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in an experimental intestinal loop obstruction model of rats. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 198, n. 1, p. 1-9, 2002.

ALIZADEH *et al.* Albendazole versus metronidazole in the treatment of patients with giardiasis in the Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, Vol. 12, No. 5, 2006.

AMAT C, MOTTA JP, BHARGAVA A, CHADEE K, BURET AG. *Giardia duodenalis* depletes goblet cell mucins and degrades MUC2, facilitating bacterial translocation. **FASEB J**. 2015;29(1):507.1.

AMER, Eglal I.; MOSSALLAM, Shereen F.; MAHROUS, Hoda. Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. **Experimental parasitology**, v. 146, p. 52-63, 2014.

ANKARKLEV J, JERLSTROM-HULTQVIST J, RINGQVIST E, TROELL K, SVÄRD SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nat Rev Microbiology**, 8:413-422, 2010.

ARAÚJO, N.S.; *et al.* *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. **Exp. Parasitol.**, v. 118, p. 449-57, 2008.

ARÉVALO, F. *et al.* Duodenal villous atrophy, an unexpectedly common finding in *Giardia lamblia* infestation. **Revista de gastroenterología del Perú: órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú**, v. 30, n. 4, p. 272-276, 2009.

ASTIAZARÁN-GARCÍA *et al.* Crosstalk between Zinc Status and *Giardia* Infection: A New Approach. **Nutrients**, 7, 4438-4452, 2015.

ATUMA C, *et al.* The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol* 2001, 280: G922-G929, 2001.

BANSAL D, AHATTI HS, SEHGAL R. Altered lipid parameters in patients infected with *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Giardia lamblia*. **Br. J. Biomed. Sci.**, 62 (2):63-65, 2005.

BARREAU, Frédérick *et al.* Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. **Gut**, v. 59, n. 2, p. 207-217, 2010.

BARTELT LA *et al.* Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. **J Clin Invest**, 123(6): 2672–2684, 2013.

BASSILY S, FARID Z, MIKHAIL JW, KENT DC, LEHMAN JS. The treatment of *Giardia lamblia* infection with mepacrine, metronidazole and furazolidone. **J Trop Med Hyg** 73: 15–18, 1970.

BEHRENS, Wiebke *et al.* Role of energy sensor TlpD of *Helicobacter pylori* in gerbil colonization and genome analyses after adaptation in the gerbil. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3534-3551, 2013.

BELOSEVIC, M.; *et al.* *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. **Journal of Infectious Diseases**. v. 147, p. 222–226, 1983.

BÉNÉRÉ, Ely *et al.* Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A I, A II, B and e in the gerbil model. **Parasitology**, v. 139, n. 04, p. 424-433, 2012.

BENYACOUB, J. *et al.* *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. **Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p.1171-1176, 2005.

BERKMAN D.S. *et al.* Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in the late childhood: a follow-up study. **Lancet**, 359: 564–571, 2002.

BERNANDER R., PALM J.E., SVARD S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell. Microbiol.**, 3: 55–62, 2001.

BESIRBELLIOGLU, B.A. *et al.* *Saccharomyces boulardii* and infection due to *Giardia lamblia*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.38, n.6-7, p.479-481, 2006.

BILLOO, A.G.; *et al.* Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. **World J Gastroenterol.** v. 12, n28, p. 4557-4560, 2006.

BODDY, A.V.; *et al.* Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. **Pharm. Res.**, v. 8, p. 796- 800, 1991.

BOREHAM PFL, BENRIMOJ S, ONG M, CRAIG M, SHEPHERD RW, *et al.* A compliance study in pediatrics patients receiving treatment for giardiasis. **Aus J Hosp Pharm** 16: 138–142, 1986.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 9 jan. 2002. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059 &Word=>>>. Acesso em: 20 Jun. 2015.

BURET AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. **Parasite**, 15(15): 261-265, 2008.

BURET, Andre G. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. **Gut**, v. 56, n. 3, p. 316-317, 2007.

BURET, A.; *et al.* Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Gastroenterology**, v.103, p.506–13, 1992.

BURET, A.; *et al.* Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. **J. Parasitol.** v.76, p. 403-409, 1990.

BUSATTI H, SANTOS J, GOMES M. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? **Biologics Targets & Therapy** 2009; 3:273-87.

BUTS *et al.* *Saccharomyces boulardii* Produces in Rat Small Intestine a Novel Protein Phosphatase that Inhibits *Escherichia coli* Endotoxin by Dephosphorylation. **Pediatric Research**. Vol. 60, No. 1, 2006.

BUTS, J.P., DE KEYSER, N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. **Dig. Dis. Sci.** 51, 1485–1492, 2006.

CABALLERO-FRANCO, C.; *et al.* The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 292, G315–G322, 2007.

CALIARI, M.V. **Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes.** Ed. UFMG. p149, 1997.

CALLAWAY, T. R ; *et al.* Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217-225, 2008.

CANONICI, A.; *et al.* *Saccharomyces boulardii* Improves Intestinal Cell Restitution through Activation of the $\alpha 2\beta 1$ Integrin Collagen Receptor. **PLoS ONE**. v.3, n. 3, p 1-12, 2011.

CARRANZA PG & LUJAN HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. **Microbes and Infection**, 12: 71-80, 2010.

CASTAGLIUOLO *et al.* *Saccharomyces boulardii* Protease Inhibits *Clostridium difficile* Toxin A Effects in the Rat Ileum. **Infection and Immunity**, Vol. 64, No. 12, p. 5225–5232, 1996.

CASTRO, E.D.R *et al.* Enteropathogens detected in a daycare center, Southeastern Brazil: bacteria, virus, and parasite research. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 27-32, 2015.

CEVALLOS A., CARNABY S., JAMES M. & FARTHING M. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain-independent. **Gastroenterology**, 1995, 109 (3), 766-773.

CHIN, A.C.; *et al.* Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. **Infect Immun** **70**: 3673–3680, 2002.

CHIRGWIN SR, COLEMAN SU, PORTHOUSE KH, NOWLING JM, PUNKOSDY GA, KLEI TR. Removal of *Wolbachia* from *Brugia pahangi* is closely linked to worm death and fecundity but does not result in altered lymphatic lesion formation in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Infect. Immun**, 71: 6986–6994, 2003.

COLLIER, S. A. *et al.* Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 11, p. 2003-2013, 2012.

COLLIGNON, A.; *et al.* *Saccharomyces boulardii* modulates dendritic cell properties and intestinal microbiota disruption after antibiotic treatment. **Gastroenterol Clin Biol**. v. 34, S.71-78, 2010.

COTTON J, BEATTY J, BURET AG. Host-parasite interactions in giardiasis. **Int J Parasitol.** 41:925–33, 2011.

CUDMORE, S. L.; *et al.* Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 17, p. 783-793, 2004.

CREMONINI F., DI CARO S, COVINO M., ARMUZZI A., GABRIELLI M., SANTARELLI L. *et al.* Effect of different probiotic preparations on anti-helicobacter pylori therapy related side effects : a parallel group, triple blind , placebo-controlled study. **Am J Gastroenterol** 97:2744–9, 2002.

CZERUCKA, Dorota *et al.* *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. **Infection and immunity**, v. 68, n. 10, p. 5998-6004, 2000.

DAWSON, S. C.; *et al.* Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. **Eukaryot. Cell.** v. 317, p. 1921-1926, 2007.

DEMIRCI M, DELIBAS N, ALTUNTAS I, OKTEM F, YÖNDEN Z. Serum Iron, Zinc and Copper Levels and Lipid Peroxidation in Children with Chronic Giardiasis. *J Health Popul Nutr*, 21(1):72-75, 2003.

DENG, W. *et al.* The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poultry science**, v. 91, n. 3, p. 575-582, 2012.

DIAMOND, L.S.; *et al.* A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p. 431–432, 1978.

DINLEYICI, E.C.; *et al.* Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* and metronidazole compared to metronidazole alone in children with acute bloody diarrhea caused by amebiasis: a prospective, randomized, open label study. **Am J Trop Med Hyg.** 2009, v. 80, p. 953-5.

DOCK-NASCIMENTO, D.B.; *et al.* Rapid restoration of colonic goblet cells induced by a hydrolyzed diet containing probiotics in experimental malnutrition. **Acta Cir. Bras.** v.22, s.1, p. 72-76, 2007.

DORON S.I., HIBBERD P.L., GORBACH S.L. Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea. **J Clin Gastroenterol** , v. 42(Suppl2):S58–63, 2008.

DRUART, Céline *et al.* Modulation of the Gut Microbiota by Nutrients with Prebiotic and Probiotic Properties. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 5, p. 624S-633S, 2014.

DUCLUZEAU R, BENZAADA M. Comparative effect of a single or continuous administration of “*Saccharomyces boulardii*” on the establishment of various

strains of “*candida*” in the digestive tract of gnotobiotic mice. **Ann Microbiol (Paris)** 133:491–501, 1982.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**. v. 25, p. 259–270, 2003.

ESCOBEDO *et al.* A bibliometric study of international scientific productivity in giardiasis overing the period 1971–2010. **J Infect Dev Ctries**; v.9, n.1; 76-86, 2015.

ESCOBEDO *et al.* Sexual transmission of giardiasis: A neglected route of spread? **Acta Tropica** 132 106–111, 2014.

EVERARD, Amandine *et al.* *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01011-14, 2014.

EVERARD, Amandine; CANI, Patrice D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 73-83, 2013.

FAO/WHO Working Group, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002.

FIETTO JLR, Araújo RS, Valadão FN, Fietto LG, Brandão RL, Neves MJ, Gomes CO, Nicoli JR, Castro IM. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Can J Microbiol** 50:615–621, 2004.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 24, p.110–140, 2011.

FRANCO M, GOLOWCZYC M, ANTONI G *et al.* Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. **Journal of Medical Microbiology** 62, 1815–1822, 2013.

FONSECA, J. F. **Efeito de *Bifidobacterium longum* 51A e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em giardiase experimental.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. S1, p. s39-s49, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-378, 1989.

GARDNER T.B. & HILL D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev** 14: 114–128, 2001.

GENEROSO, Simone V. *et al.* Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European journal of nutrition**, v. 50, n. 4, p. 261-269, 2011.

GEYIK, Mehmet Faruk *et al.* The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstructive jaundice. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 88, n. 2, p. 176, 2006.

GILLIN F.D. , REINER D. S. , MCCAFFERY J. M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679–705, 1996.

GILLON, J., D. AL THAMERY, AND A. FERGUSON. 1982. Features of small intestinal pathology (epithelial cell kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary *Giardia muris* infection. **Gut** 23:498–506.

GOTO, E.; KOHROGI, H.; HIRATA, N.; TSSUMORI, K.; HIROSAKO, S.; HAMAMOTO, J.; FUJII, K.; KAWANO, O. and ANDO, M. Human Bronchial Intraepithelial T Lymphocytes as a Distinct T-Cell Subset. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** (22):405-411, 2000.

GRANADOS, Carlos E. *et al.* Drugs for treating giardiasis. **The Cochrane Library**, 2012.

GRAPHPAD PRISM 6.0. 2014. GraphPad Software, Inc. San Diego, California. USA.

GUILLOT, C.C. *et al.* Effects of *Saccharomyces boullardii* in children with chronic diarrhea, especially cases due to giardiasis. **Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría**, v.2, n.12, p.1-11, 1995.

GUTIÉRREZ, Jose Muñoz *et al.* Refractory giardiasis in Spanish travellers. **Travel medicine and infectious disease**, v. 11, n. 2, p. 126-129, 2013.

HAFEZ, M.M. Upregulation of Intestinal Mucin Expression by the Probiotic Bacterium *E. coli* Nissle 1917. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 4, e. 2, p 67-77, 2012.

HAN, Jian; COLLINS, Lesley J. Reconstruction of sugar metabolic pathways of *Giardia lamblia*. **International journal of proteomics**, v. 2012, 2012.

HANSSON, Gunnar C. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. **Current Opinion in Microbiology**. 15:57–62, 2012.

HAQUE, R.; *et al.* Amebiasis. **N Engl J Med**; v.348, p. 1565-73, 2003.

HAYAT, M. *et al.* Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? **Journal of clinical pathology**, v. 55, n. 5, p. 393-394, 2002.

HAYDAY, Adrian *et al.* Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. **Nature immunology**, v. 2, n. 11, p. 997-1003, 2001.

HAWRELAK, J.; MYERS, S. P. The Causes of Intestinal Dysbiosis: A Review. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 180-197, 2004.

HE, T.; *et al.* Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. **J. Appl. Microbiol.** v.104, p. 595–604, 2008.

HILL, Colin *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HOLZAPFEL, W.H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2(suppl.), p.365-373, 2001.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012

HUMEN, M. A.; *et al.* *Lactobacillus johnsonii* La1 Antagonizes *Giardia intestinalis* In Vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1265–1269, 2005.

IMAOKA, Akemi *et al.* Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. **European journal of immunology**, v. 26, n. 4, p. 945-948, 1996.

JAKOBSSON, Hedvig E. *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. **Gut**, v. 63, n. 4, p. 559-566, 2014.

JESEN, L. A.; *et al.* Prevalence of multigastrointestinal infections with helminth, protozoan and *Campylobacter* spp. in Guatemalan children. **Journal Infection Developing Countries**. v. 3, n.3, p. 229-234, 2009.

JIANG, Wei *et al.* Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 11, p. 2465-2476, 2013.

JIMENEZ, J.C.; *et al.* Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.11, p. 152–160, 2004.

JOKIPII L, JOKIPII AMM. Comparison of four dosage schedules in the treatment of giardiasis with metronidazole. **Infection** 6: 92–94, 1978.

KANDORI H, *et al.* Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. **Exp Anim.** v. 45, p.155–60, 1996.

KAVOUSI, Siavash. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 1979.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 77, p. 487–488, 1983.

KIM, H.; *et al.* Metronidazole-induced encephalopathy in a patient with infectious colitis: a case report. **Journal of Medical Case Reports.** v. 5, p. 1-4, 2011.

KAPPAGODA, Shanthi; SINGH, Upinder; BLACKBURN, Brian G. Antiparasitic therapy. In: **Mayo Clinic Proceedings.** Elsevier, 2011. p. 561-583.

KOOT, B.G.P.; *et al.* Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 49, n. 3, p. 304-308, 2009.

LAROCQUE R, NAKAGAKI K, LEE P, ABDUL-WAHID A, FAUBERT GM. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. **Infect Immun**, 71: 5662–5669, 2003.

LAUWAET T., DAVIDS B.J., REINER D.S. , GILLIN F.D. Encystation of *G. lamblia*: A model for other parasites. **Curr Opin Microbiol**, 10(6):554-559, 2007.

LEBBAD, M.; *et al.* Multilocus Genotyping of Human *Giardia* Isolates Suggests Limited Zoonotic Transmission and Association between Assemblage B and flatulence in Children. **PLoS Negl Trop Dis.** V. 5, e1262, 2011.

LI, Ming *et al.* Oral Administration of *Saccharomyces boulardii* Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats via Reducing Intestinal Permeability and Modulating Gut Microbial Composition. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 170-179, 2015.

LIMA JUNIOR, Oswaldo Aparecido de; KAISER, Juliana; CATISTI, Rosana. High occurrence of giardiasis in children living on a landless farm workers' settlement in Araras, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 3, p. 185-188, 2013.

LLOYD, A.B.; *et al.* Competitive exclusion as exemplified by *Salmonella typhimurium*. **Proceedings Australian Poultry Science Convention**, Hobart, Australia; p. 185–186, 1974.

LOMAX, A. R.; CALDER, P. C. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 13, p. 1428-1518, 2009.

LUJAN HD, MOWATT MR, BYRD LG, NASH TE. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 7628-7633, 1996.

LV, XIAOBO *et al.* Therapeutic efficacy of the multi-epitope vaccine CTB-UE against *Helicobacter pylori* infection in a Mongolian gerbil model and its microRNA-155-associated immuno-protective mechanism. **Vaccine**, v. 32, n. 41, p. 5343-5352, 2014.

MACK D.R., *et al.* Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. **Am J Physiol**. v. 276, p941–950, 1999.

MACK, D.R.; *et al.* Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut** v. 52, p. 827-33, 2003.

MAHMOUD *et al.* Ginger and Cinnamon: Can This Household Remedy Treat Giardiasis? Parasitological and Histopathological Studies. **Iranian J Parasitol** : Vol. 9, No. 4, pp.530-540, 2014.

MAIOLI, Tatiani Uceli *et al.* Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 6, 2014.

MANSOUR-GHANAIE F.; *et al* Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. **World J Gastroenterol** v.9,p. 1832-1833, 2003.

MARTINS FS, NARDI RMD, ARANTES RME, ROSA CA, NEVES MJ, NICOLI JR Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **J Gen Appl Microbiol** 51:83–92, 2005.

MARTINS FS, RODRIGUES ACP, TIAGO FCP, PENNA FJ, ROSA CA, ARANTES RME, NARDI RMD, NEVES MJ, NICOLI JR. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **J Med Microbiol** 56:352–359, 2007.

MARTINS, Flaviano S. *et al.* Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against Salmonella infection in mice. **Microbes and infection**, v. 15, n. 4, p. 270-279, 2013.

MCCLEMENS, J.; *et al.* Treatment with probiotic bacteria during enteric parasite infection up regulates goblet cell hyperplasia and Promotes Host Defense. **Gastroenterology**. v. 138, e.5, p.S-618-S-618, 2010.

MCFARLAND L. V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. **Clinical Infectious Diseases**;60(S2):S85–90, 2015.

MCFARLAND L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World J Gastroenterol** , v. 16, p.2202–22, 2010.

MCFARLAND L. V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. **Am J Gastroenterol** 101:812–822, 2006.

MELTZER, Eyal *et al* Treatment of Giardiasis after Nonresponse to Nitroimidazole. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 20, No. 10, 2014.

MOWAT, Allan M.; AGACE, William W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, 2014.

NIEUWDORP, Max *et al.* Role of the microbiome in energy regulation and metabolism. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1525-1533, 2014

NOLAN, Thomas J. *et al.* *Strongyloides stercoralis*: the first rodent model for uncomplicated and hyperinfective strongyloidiasis, the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1479-1484, 1993.

OBERHUBER G, *et al.* Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. **Scand. J. Gastroenterol**, 32: 48–51, 1997.

O'HALLORAN, E.; *et al.* Metronidazole-Induced Pancreatitis. **HPB Surgery**. v. 2010, p.1-4, 2010.

OZEN, A. E.; *et al.* Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v.70, n. 8, p. 472-481, 2012.

PAGET, Timothy A.; MACECHKO, P. Timothy; JARROLL, Edward L. Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during differentiation. **The Journal of parasitology**, p. 222-226, 1998.

PEDRAZA D. F., QUEIROZ D. SALES M. C. Doenças infecciosas em crianças pré-escolares brasileiras assistidas em creches. **Ciência & Saúde Coletiva**, 19(2):511-528, 2014

PENA, Hilda FJ *et al.* Isolation and biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from canine cutaneous toxoplasmosis in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4419-4420, 2014.

PEREZ PF, MINAARDE J, ROUVET M, *et al.* Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from lactobacilli: an in vitro study. **Appl Environ Microbiol**; 67(11):5037-42, 2001.

POLEY, J. R.; S. ROSENFELD. Malabsorption in giardiasis: presence of a luminal barrier (mucoid pseudomembrane). A scanning and transmission electron microscopic study. **J. Pediatr. Gastroenterol.** v. 1, p. 63–80, 1982.

POWER *et al.* Intestinal microbiota, diet and health. **British Journal of Nutrition** v.111, p. 387–402, 2014.

PURCHIARONI F., A. TORTORA, M. GABRIELLI, F. BERTUCCI, G. GIGANTE, G. IANIRO, *et al* The role of intestinal microbiota and the immune system. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**; 17: 323-333, 2013.

PUTIGNANI, Lorenza *et al.* The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. **Pediatric research**, v. 76, n. 1, p. 2-10, 2014.

QIN J, LI R, RAES J, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, p. 59–65, 2010.

QUACH, Jeanie; ST-PIERRE, Joëlle; CHADEE, Kris. The future for vaccine development against *Entamoeba histolytica*. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 6, p. 1514-1521, 2014.

QUIHUI-COTA, Luis *et al.* Marked Antigiardial Activity of *Yucca baccata* Extracts: A Potential Natural Alternative for Treating Protozoan Infections. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RIEGER, J. *et al.* Intraepithelial lymphocyte numbers and histomorphological parameters in the porcine gut after *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 feeding in a *Salmonella* Typhimurium challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 164, n. 1, p. 40-50, 2015.

ROSELLI, Marianna *et al.* Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of $\gamma\delta$ T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Inflammatory bowel diseases**, v. 15, n. 10, p. 1526-1536, 2009.

ROSENFELDT V, BENFELDT E, HENRIK VALERIUS N, PAERREGAARD A, FLEISCHER MICHAELSEN. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. **J Pediatr**; 145: 612-6, 2004.

ROSKENS, H.; ERLANDSEN, S.L. Inhibition of in vitro attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. **J Parasitol.** v.88, p. 869–873, 2002.

SAEED, M. Quraishy *et al.* Influence of the Gut Microflora and of Biliary Constituents on Morphological Changes in the Small Intestine in Obstructive Jaundice. **HPB Surgery**, v. 10, n. 1, p. 11-20, 1900.

SAKARYA, Serhan; GUNAY, Necati. *Saccharomyces boulardii* expresses neuraminidase activity selective for $\alpha 2$, 3-linked sialic acid that decreases *Helicobacter pylori* adhesion to host cells. **APMIS**, v. 122, n. 10, p. 941-950, 2014.

SAKI J, KHADEMVATAN S, MARAGHI S, SOLTANI S. Serum lipid profiles and eosinophilia among *Giardia* cyst passers. **African Journal of Microbiology Research**, 5(27):4881-4884, 2011.

SAKSIRISAMPAN, W.; *et al.* Prevalence of giardiasis and genotypic characterization of *Giardia duodenalis* in hilltribe children, Northern Thailand. *Tropical Biomedicine*. v.29, n.3, p. 331–338, 2012.

SANDERSON IR. Dietary modulation of GALT. *J Nutr* 2007; 137 (Suppl 11): 2557S-62

SAVIOLI L, SMITH H, THOMPSON A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends Parasitol*, 22: 203–208, 2006.

SCALDAFERRI, Franco *et al.* The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 46, p. S12-S17, 2012.

SCALLAN E., HOEKSTRA R.M., ANGULO F.J., *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg Infect Dis** 17:7–15, 2011.

SCOTT, Kevin G.-E.; LINDA, C. H.; BURET, André G. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. **Infection and immunity**, v. 72, n. 6, p. 3536-3542, 2004.

SCOTT, KG-E. *et al.* Jejunal Brush Border Microvillous Alterations in *Giardia muris*-Infected Mice: Role of T Lymphocytes and Interleukin-6. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3412-3418, 2000.

SHARMA R, YOUNG C, NEU J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. **J Biomed Biotechnol.**; 2010:305879, 2010.

SHELTON, A. A. Sexually Transmitted Parasitic Diseases. **Clinics in colon and rectal surgery**, v.17, p. 231-234, 2004.

SHEPHERD R.W., BOREHAM P.F.L. Recent advances in the diagnosis and management of giardiasis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 169: 60–64, 1986.

SHUKLA, G., KAUR, H., & SHARMA, L. Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. **Parasitology research**, 112(6), 2143-2149, 2013.

SHUKLA, Geeta; SIDHU, Ramandeep Kaur; VERMA, Angela. Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 1, p. 61-72, 2012.

SHUKLA, G.; *et al.* Protactive potential of *L.acidophilus* in murine giardiasis. **CEJMed.** v. 5, e. 4, p. 456-463, 2010.

SHUKLA, G.; *et al.* Probiotic characterization of lactobacilli and yeast strains isolated from whey beverage and therapeutic potential of lactobacillus yoghurt in murine giardiasis. **American Journal of Biomedical Science**, v.2, e. 3, p. 248-261, 2010.

SHUKLA, G.; *et al.* Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. **Dig Dis Sci.** v. 53, p.2671–2679, 2008.

SINGER, S.M.; NASH, T.E. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. **J Infect Dis.** v. 181, p.1510–15122, 2000.

SOLAYMANI-MOHAMMADI S. & SINGER S.M. Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. **J Immunol**, 187 (7): 3769-3775, 2011.

SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; *et al.* A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e 682, 2010.

SOUGIOULTZIS, Stavros *et al.* *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-κB-mediated IL-8 gene expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 343, n. 1, p. 69-76, 2006.

STANLEY JR, S.L. Amoebiasis. **Lancet.** v. 361, p. 1025-1034, 2003.

STOLTZFUS, Jonathan D. *et al.* RNAseq Analysis of the Parasitic Nematode *Strongyloides stercoralis* Reveals Divergent Regulation of Canonical Dauer Pathways. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, 2012.

SULEMAN *et al.* Quality of Medicines Commonly Used in the Treatment of Soil Transmitted Helminths and *Giardia* in Ethiopia: A Nationwide Survey. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v. 8, n. 12, 2014.

SZAJEWSKA H., RUSZCZYNSKI M., RADZIKOWSKI A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. **J Pediatr**, v. 149, p. 367–72, 2006.

SZAJEWSKA, H.; HORVATH, A.; KOŁODZIEJ, M. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* supplementation and eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 41, n. 12, p. 1237-1245, 2015.

SZAJEWSKA H, HORVATH A, PIWOWARCZYK A. Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. **Aliment Pharmacol Ther**, v.32, p1069–79, 2010.

TISSIER, HY. Intestinal Flora of Infants. **Recherches Sur la Flore Intestinale des Nourrissons.**) These, Paris, n. 529, p. 253, 1900.

TEJMAN-YARDEN N, MILLMAN M, LAUWAET T, DAVIDS BJ, GILLIN FD, DUNN L, UPCROFT JA, MIYAMOTO Y, ECKMANN L. Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 55, p. 4643– 4651, 2011.

THOMPSON K, APPEGATE T. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poult Sci** 85: 1535–1540, 2006.

TORRES, M.R.F. **Influência da microbiota intestinal na patogênese da giardíase em camundongos convencionais e isentos de germes.** Dissertação (Mestrado em Infectologia e Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

TORRES MF, UETANABARO AP, COSTA AF, *et al.* Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. **J Med Microbiol Mar**; (3):209-15, 2000.

TRAVERS, M.; *et al.* Probiotics for the Control of Parasites: An Overview. **Journal of Parasitology Research**. v. 2011, p.1-11, 2011.

TROEGER, H.; *et al.* Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. **Gut**, v. 56, p. 328-335, 2007.

UMESAKI Y., H. Setoyama, S. Matsumoto, Y. Okada, **Immunology** 79, 32 (1993).

UPCROFT P., UPCROFT J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol**, 14: 150 –164, 2001.

UYSAL *et al.* Twenty-Five years of Intestinal Parasite Prevalence in İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine: A Retrospective Study. **Turkiye Parazit Derg** 38: 97-101, 2014.

VASILE, N.; *et al.* Probiotics - an alternative treatment for various Diseases. **Romanian Archives of Microbiology and Immunology**. v. 70, n.2, p. 54-9, 2011.

VENTURA, Luciana Laranjo Amorim *et al.* Changes in oxidative stress and lipoprotein in malnourished gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 62-66, 2014.

VENTURA, L.L.; *et al* Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. **Exp Parasitol.** v.133, n. 4, p. 391-395, 2013.

VIEIRA, P. B.; *et al*. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. **Revista HCPA.** V. 32, n.1, p. 58-70, 2012.

VINAYAK, V. K., R. Khanna, and K. Kum. Kinetics of intraepithelium and lamina propria lymphocyte responses during *Giardia lamblia* infection in mice. **Microb. Pathog.** **10**:343–350, 1991

VRESE, M.; SCHREZENMEIR J. Probiotics, prebiotics, synbiotics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.** v. 111, p. 1-66, 2008.

VRIEZE, Anne *et al*. Vancomycin decreases insulin sensitivity and is associated with alterations in intestinal microbiota and bile acid composition in obese subjects with metabolic syndrome. **The role of gut microbiota in human metabolism**, p. 117, 2013.

WALK, S.T.; *et al*. Alteration of the Murine Gut Microbiota During Infection with the Parasitic Helminth *Heligmosomoides polygyrus*. **Inflam Bowel Dis** v. 16, p. 1841–9, 2010.

WATKINS & ECKMANN. Treatment of Giardiasis: Current Status and Future Directions. **Curr Infect Dis Rep.** 16:396, 2014.

WEI, Yongfang *et al*. Permissibility of Mongolian gerbil for *Angiostrongylus cantonensis* infection and utility of this animal model for anthelmintic studies. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1687-1693, 2014.

WONG, Julia MW *et al*. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235-243, 2006.

WRIGHT JM, DUNN LA, UPCROFT P, UPCROFT JA Efficacy of anti giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf** 2: 529–541, 2003.

YODER, J.S., *et al*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Giardiasis surveillance—United States, 2009–2010. **MMWR Surveill Summ.** v. 61, Supl. 05, p. 13–23, 2012.

XIE, Chuan *et al*. *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils does not initiate hematological diseases. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 34, p. 12308, 2014.

ZIPPERER, Ginger R. *et al*. *Brugia pahangi*: immunization with early L3 ES alters parasite migration, and reduces microfilaremia and lymphatic lesion formation in gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 446-455, 2013.