



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Influência da imunossupressão sobre a enterite experimental produzida por *Giardia lamblia* em modelo murino *Meriones unguiculatus*

RHUANA DA SILVA AMARAL

Belo Horizonte

2018

Influência da imunossupressão sobre a enterite experimental produzida por *Giardia lamblia* em modelo murino *Meriones unguiculatus*

RHUANA DA SILVA AMARAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Aparecida Gomes

Co-orientador: Prof^º. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Belo Horizonte

2018

Colaboradores:

Msc. Joice de Freitas Fonseca – Departamento de Parasitologia – ICB (UFMG)

Msc. Mayana R.S. Ribeiro – Departamento de Parasitologia – ICB (UFMG)

Msc. César Augusto Vilela Da Silva – Departamento de Patologia geral – ICB (UFMG)

Dra. Denise Carmona Cara Machado – Departamento de Morfologia – ICB (UFMG)

Dr. Valbert N. Cardoso – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – (UFMG)

Dra. Maria E. R. Andrade – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – (UFMG)

*“O senhor saiba: eu toda a minha vida pensei por mim, fôro, sou nascido diferente. Eu sou é eu mesmo (...)
O senhor concedendo, eu digo: para pensar longe, sou cão mestre – o senhor solte em minha frente uma ideia ligeira, e eu rastreio essa por fundo de todos os matos.”*

Guimarães Rosa in ‘O grande sertão veredas’; 2001, p. 31.

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 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À mulher mais corajosa que conheci: mamãe.

Ao meu amado e divertido irmão, Welbert.

À minha avó Conceição pela doçura e cumplicidade.

Ao meu avô Agnelo pelo exemplo de amor, caráter e integridade.

À doce memória da minha bisavó Gabriela.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa de seu coordenador Professor Ricardo Toshio Fujiwara, pela oportunidade concedida, pela confiança, pela formação e aprendizado, e por facilitar a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo socorro bem presente na hora da angústia, pelos milagres diários, pela inspiração em cada palavra deste trabalho, pelos anjos com os quais me presenteou, pelas 'portas' abertas e pela Sua luz que iluminou todo este trajeto;

À minha amada orientadora Cidinha, por depositar em mim plena confiança e cuidado, e por me regar com palavras de afeto e encorajamento que me sustentaram durante os momentos em que pensei que não iria conseguir, me permitindo florescer em amadurecimento e gratidão;

Ao meu querido co-orientador Marcelo pela disponibilidade, pronta ajuda, ensinamentos e fundamental apoio para a concretização deste trabalho;

Aos queridos colegas do LAPI e LPP: Ruth, Rodrigo, Rafael, Angelina, Fernandinha, Gabriel, Rafaela, César, Fabrício, Isabela e Greyce pelas risadas e cafés, e em especial às queridas Joice e Mayana, pela amizade e companheirismo, e por dividirem comigo os fardos dos dias ruins e os sorrisos dos dias bons. Joi, pra sempre serei sua pupila!

Ao querido Joãozinho pelos preciosos ensinamentos técnicos e pelas conversas divertidas, e ao Orlando, Carlinhos e Thaís por todo apoio técnico, fundamental para que este trabalho fosse realizado com a melhor qualidade possível;

Aos colaboradores diretos e indiretos deste trabalho, que não mediram esforços para que eu obtivesse êxito em todos os objetivos propostos;

Ao "Motim" pela alegria da convivência e por vivenciarem comigo numerosos momentos de festa, gargalhadas e ótimas recordações;

Aos professores do Departamento de Parasitologia da UFMG, em especial à professora Grasielle Caldas pela paciência, conselhos e ensinamentos para que este trabalho se tornasse prazeroso ao leitor;

À minha grande amiga Jéssica pela cumplicidade, e à minha afilhadinha Jú por acalantar o meu coração, ao meu amigo André por estar comigo em todos os momentos, e a todos os meus amigos de alma por se orgulharem de mim e me ajudarem a chegar até aqui;

À minha mãe, irmão, avós, avôs, tios, tias, primos, primas e a toda a minha família pelo prazer de chama-los 'meus', e por permitirem que eu me sinta amada;

Ao meu pai Agnaldo, à Leude, Margarida e ao meu maninho Jonatas: meu amor por vocês é bem maior do que este oceano atlântico que nos separa, amo vocês;

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Parasitologia: Sumara e Sibebe, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos;

À CAPES por disponibilizar-me a bolsa de estudos;

À UFMG pelo orgulho de fazer-me sua 'filha'.

Muito obrigada!

RESUMO

A giardíase, enteroparasitose cosmopolita causada pelo protozoário *Giardia lamblia*, se encontra dentre as doenças diarreicas mais recorrentes nos países desenvolvidos e, principalmente, nos países em desenvolvimento, sendo responsável pela ocorrência de síndromes má-digestivas e déficits físicos e cognitivos em crianças residentes. Dentre os grupos de vulnerabilidade na giardíase, incluem-se os indivíduos imunossuprimidos em decorrência de terapias cada vez mais agressivas, utilizadas para o tratamento de doenças auto-imunes ou transplantes de órgãos. Nessa população, a giardíase pode resultar em cronicidade e gravidade da infecção. No entanto, alguns indivíduos imunodeficientes podem permanecer assintomáticos, ainda que infectados pelo parasito durante longos períodos. Diante das controvérsias que envolvem a giardíase em hospedeiros imunossuprimidos, buscou neste trabalho contribuir para a elucidação do assunto, por meio da avaliação da permeabilidade intestinal e da análise histopatológica e morfométrica no intestino delgado de gerbils, experimentalmente imunossuprimidos e infectados por *G. lamblia*. Utilizou-se 35 gerbils com 4 a 6 semanas de idade, distribuídos em 4 grupos experimentais, a saber: (CT) Controle (n=8), (CTIn) Controle-infectado por *G. lamblia* (n=9), (IM) Imunossuprimido (n=9) e (IMIn) Imunossuprimido-infectado por *G. lamblia* (n=9). Os animais dos grupos IM e IMIn receberam, durante 25 dias, um tratamento com Dexametasona via intramuscular, para a indução de imunossupressão. No 11º dia experimental, os animais dos grupos CTIn e IMIn foram desafiados com trofozoítos de *G. lamblia*, e permaneceram infectados durante 14 dias. No 25º dia experimental, administrou-se nos gerbils de todos os grupos, uma solução contendo ^{99m}Tc-DTPA para a medição da permeabilidade intestinal. Após esse procedimento, realizou-se a eutanásia dos animais, seguida da coleta e do processamento histopatológico do intestino delgado e do baço. Os tecidos foram analisados por meio de histopatologia, morfometria digital e reação imuno-histoquímica para o parasitismo. As análises histopatológicas e morfométricas evidenciaram lesões significativas na mucosa duodenal do grupo CTIn, com vilosidades reduzidas de tamanho, criptas hiperplásicas, infiltrado inflamatório moderado na lâmina própria congruentes com o aumento da taxa de renovação epitelial do tecido. Por outro lado, no grupo IMIn, observou-se ausência de inflamação, criptas intestinais profundas, porém, com vilosidades longas, delgadas e íntegras. As células caliciformes no grupo IMIn se apresentaram hiperplásicas e culminaram em aumento na produção de muco intestinal. Observou-se ainda, no grupo IMIn aumento significativo no número de trofozoítos de *G. lamblia* imunomarcados no lúmen dos animais. Não foram observadas alterações na permeabilidade intestinal dos gerbils experimentados. Conclui-se, portanto, que a redução dos danos à mucosa intestinal observada nos animais imunossuprimidos, infere que a resposta imune do hospedeiro seja a principal responsável pelo surgimento das lesões durante a enterite produzida por *G. lamblia*, no modelo experimentado. A proteção da integridade intestinal, em animais imunossuprimidos, particularmente, demonstra importante ação do sistema imune inato, representado pelo muco, que se apresentou como um agente dificultador à adesão ao epitélio intestinal pelos trofozoítos de *G. lamblia*. O aumento do número de parasitos no lúmen intestinal dos gerbils do grupo IMIn, confirma a cronicidade observada em humanos imunossuprimidos acometidos por giardíase, suscitando os gerbils como bons modelos para o estudo de infecções por *G. lamblia* em hospedeiros imunossuprimidos.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, Giardíase, Imunossupressão, Histopatologia intestinal, morfometria intestinal, Permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

The giardiasis, cosmopolitan enteroparasitosis caused by the protozoan *Giardia lamblia* is among the most recurrent diarrheal diseases in developed countries and especially in developing countries, being responsible for poor digestion's syndromes, physical and cognitive deficits in resident children. Among the groups of vulnerability in the management, include the main immunosuppressed, as a result of aggressive therapies used for the treatment of autoimmune diseases or organ transplants. In this population, giardiasis can result in chronicity and more severe infection. However, many immunodeficient individuals remain asymptomatic, although infected by the parasite for long periods. In view of this controversy, the aims of this study were to contribute to the elucidation of the subject through the evaluation of small intestinal permeability, histopathological and morphometric analysis in gerbils experimentally immunosuppressed and infected by *G. lamblia*. In this study were used 35 gerbils 4 to 6 weeks old distributed in 4 experimental groups: Control (CT) [n = 8], Control-infected by *G. lamblia* (CTIn) [n = 9], Immunosuppressed (IM) [n = 9] and Immunosuppressed-infected by *G. lamblia* (IMIn) [n = 9]. The animals of the IM and IMIn groups received a treatment with Dexamethasone intramuscularly for 25 days for induction of immunosuppression. On the 11th experimental day, animals in the groups CTIn and IMIn were challenged with *G. lamblia* trophozoites remained infected for 14 days. On the 25th experimental day was administered on gerbils of all groups, a solution containing ^{99m}Tc-DTPA for evaluation of intestinal permeability. After this procedure, the euthanasia of the animals was produced, followed by collection and histopathological processing of the small intestine and spleen. The tissues were analyzed by histopathology, digital morphometry and immunohistochemistry for parasitism. Histopathological and morphometric analyzes revealed significant lesions in the duodenal mucosa of the CTIn group, with reduced villi size, hyperplastic crypts, moderate inflammatory infiltrate in the lamina propria and high rate of tissue epithelial renewal. On the other hand, in the IMIn group no inflammatory events were seen and villi were long, thin and intact. Goblet cells in the IMIn group were hyperplastic and culminated in increased production of intestinal mucus. Furthermore, in the IMI group, a significant increase in the number of *G. lamblia* trophozoites immunolabelled in the lumen of the animals was observed. No changes were observed in the intestinal permeability of the gerbils experienced. Thus, the reduction of intestinal damage in the intestinal mucosa of immunosuppressed animals, inferred an immune response of the host is one of the main responsible for the emergence of interactions during infection by *G. lamblia* in the experienced model. The protection of the intestinal gut in immunosuppressed animals, in particular, is an important action of the immune system, represented by mucus, which presents as an agent that makes it difficult for adhesion to the intestinal epithelium by *G. lamblia* trophozoites. The increase in the number of parasites in the gut of gerbils of the IMIn group confirms a chronicity observed in immunosuppressed men affected by giardiasis, such as gerbils as good models for the study of *G. lamblia* infections in immunosuppressed hosts.

Key-words: *Giardia lamblia*, Giardiasis, Immunosuppression, Intestinal histopathology, Intestinal morphometry, Intestinal permeability.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α -giardina	alfa-giardina
β -giardina	beta-giardina
δ -giardina	delta-giardina
γ - giardina	gama-giardina
μL	microlitro
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
$^{\circ}\text{c}$	graus Celsius
$^{99\text{m}}\text{TC}$	tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{TC-DTPA}$	ácido dietilenotriaminopentacético marcado com $^{99\text{m}}\text{TC}$
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
ATCC	American Type Culture Collection
CD4^+	grupamento de diferenciação 4
CD8^+	grupamento de diferenciação 8
CDL	contagem diferencial de leucócitos
CEUA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
cm	centímetro
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CT	grupo controle-sadio
CTIn	grupo controle-infectado
CTL	contagem total de leucócitos
DALY's	anos de vida perdidos ajustados por incapacidade, do inglês “disability-adjusted life year”
DEX	Dexametasona
GalNAc	β (1-3)-N-acetil-d-galactosamina
H&E	hematoxilina e eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês “human immunodeficiency virus”
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
CE's	células epiteliais intestinais

IL-	interleucina
INF- γ	interferon-gama
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IM	grupo imunossuprimido
IMIn	grupo imunossuprimido-infectado
kDa	kilodalton
LAPI	Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais
MBq	megabecquerel
mg	miligrama
mL	mililitro
mm ³	milimetro cúbico
Na ^{99m} TcO ₄	Pertecnetato de sódio
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	ácido periódico de Schiff
PAS ⁺	região PAS positiva
PBS	tampão fosfato-salino
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
TJ	Complexo junções firmes, do inglês “tight junctions complex”
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia do Trofozoítio de <i>G. lamblia</i> em posição ventral. Em evidência: o disco adesivo e os flagelos (setas).....	25
Figura 2	Fotomicrografia de varredura evidenciando o Cisto de <i>G. lamblia</i>	26
Figura 3	Distribuição geográfica de <i>G. lamblia</i> ao longo do globo.....	31
Figura 4	Mecanismos de defesa do hospedeiro contra a <i>G. lamblia</i>	40
Figura 5	Fluxograma representativo do delineamento experimental utilizado neste trabalho.....	47
Figura 6	Fórmula estrutural da Dexametasona.....	48
Figura 7	Escore histológico para caracterização das lesões histopatológicas na mucosa duodenal de gerbils.....	53
Figura 8	Análise da permeabilidade duodenal de gerbils através da dose (%) de DTPA detectada no sangue dos animais, após 4h da gavagem da solução. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por <i>G. lamblia</i> ; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por <i>G. lamblia</i> (IMIn). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. *p<0,05; one-way ANOVA e Tukey.....	59
Figura 9	Fotomicrografias do baço de gerbils. (a) grupo controle (CT): baço de aspecto histológico normal. Polpa branca (*) e polpa vermelha (#); (b) grupo controle-infectado por <i>G. lamblia</i> (CTIn): baço evidenciando hiperplasia da polpa branca (*); (c) grupo imunossuprimido não-infectado (IM): baço evidenciando região de polpa branca reduzida (*); (d) grupo imunossuprimido infectado por <i>G. lamblia</i> (IMIn): região de polpa branca também reduzida (*). Hematoxilina & Eosina. Barra 100 = µm.	60
Figura 10	Fotomicrografias do duodeno de gerbils. (a) grupo controle (CT): mucosa intestinal com arquitetura da mucosa preservada e ausência de inflamação; (b) grupo controle-infectado por <i>G. lamblia</i> (CTIn): edema leve (#), infiltrado inflamatório moderado (*) criptas hiperplásicas (cabeça de seta), vilosidades achatadas (seta preta); (c) Detalhe da figura anterior mostrando infiltrado inflamatório na lâmina própria (*); (d) grupo imunossuprimido não-infectado (IM): mucosa duodenal de aspecto normal; (e) grupo imunossuprimido-infectado por <i>G. lamblia</i> (IMIn): presença de edema moderado (#) e hiperplasia das criptas (*). Hematoxilina	

& Eosina. (a,b,d,e): Barra = 100 μm ; (c): Barra = 10 μm62

Figura 11 Avaliação semi-quantitativa das lesões da mucosa duodenal de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes = $p < 0,05$; Barras pretas = infectados, Barras brancas = controles. One-way ANOVA e Tukey.....63

Figura 12 Altura (μm) das vilosidades duodenais de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.....64

Figura 13 Profundidade (μm) das criptas duodenais de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.....64

Figura 14 Relação Cripta/Vilosidade duodenais de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.....65

Figura 15 Fotomicrografias de duodeno de gerbils evidenciando as áreas positivas para muco intestinal (a) grupo controle (CT): mucosa intestinal com aspecto histológico normal mostrando regiões coradas por Ácido Periódico de Schiff (PAS); (b) grupo controle-infectado por *G. lamblia* (CTIn): mucosa intestinal evidenciando criptas hiperplásicas (#), infiltrado inflamatório moderado na lâmina própria (*) e discreto aumento de regiões PAS+ (cabeça de seta); c) grupo imunossuprimido não-infectado (IM): regiões PAS+ apresentam um padrão semelhante à mucosa intestinal normal; d) grupo imunossuprimido-infectado por *G. lamblia* (IMIn): maiores regiões PAS+ e hiperplasia de células caliciformes (cabeças de seta). (e) maior aumento da figura anterior evidenciando as células caliciformes. Ácido Periódico de Schiff. (a, b, c, d): Barra = 100 μm ; (e) Barra = 20 μm66

Figura 16 Área (μm^2) de marcação PAS positiva na mucosa duodenal de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como mediana e intervalos interquartis. * $p < 0,05$; Kruskal Wallis e Dunn.67

Figura 17 Fotomicrografias de reação imuno-histoquímica para trofozoítos de *Giardia lamblia*. (a) grupo imunossuprimido-infectado por *G. lamblia* (IMIn): presença de grande número trofozoítos de *G. lamblia* imunomarcados no lúmen intestinal (setas); (b) Maior aumento da figura anterior mostrando trofozoítos imunomarcados (setas); (c) Grupo controle-infectado por *G. lamblia* (CTIn): presença de trofozoítos de *G. lamblia* imunomarcados no lúmen intestinal. Hiperplasia de criptas (*). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. (a,c): Barra = 100 μm ; (b) Barra = 10 μm68

Figura 18 Área de marcação imuno-histoquímica positiva para trofozoítos de *G. lamblia* na mucosa duodenal de gerbils infectados. (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; test T student69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contagens total e diferencial de leucócitos circulantes de gerbils, antes e após tratamento com dexametasona durante 25 dias.....	58
-----------------	---	-----------

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	16
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Giardia</i>	22
1.1.1 Taxonomia e nomenclatura	22
1.1.2 Variação genética	23
1.1.3 Formas evolutivas	24
1.1.4 Ciclo biológico	27
1.2 Giardíase	28
1.2.1 Importância e Epidemiologia	28
1.2.2 Manifestações clínicas e fisiopatológicas	31
1.2.3 Permeabilidade intestinal	34
1.2.4 Resposta imunológica	36
1.3 Terapia imunossupressora	41
1.3.1 Glicocorticoides	41
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Animais	46
4.2 Delineamento experimental	46
4.3 Imunossupressão	48
4.3.1 Leucograma	48
4.4 Ajuste do inóculo e infecção experimental por <i>Giardia lamblia</i>	49
4.5 Estudo da permeabilidade intestinal	50
4.5.1 Marcação do DTPA com ^{99m} Tc	50
4.5.2 Medição da permeabilidade intestinal	50
4.6 Obtenção das amostras biológicas para análise	51
4.6.1 Carcaças contendo material radioativo	51
4.7 Análises histopatológicas	51
4.8 Morfometria da mucosa intestinal	53

4.9	Reação imuno-histoquímica e quantificação da carga parasitária.....	54
4.10	Análise Estatística.....	55
5.	RESULTADOS	57
5.1	Parâmetros gerais.....	57
5.2	Imunossupressão.....	57
5.2.1	Leucograma.....	57
5.3	Análise da Permeabilidade Intestinal.....	58
5.4	Análises histopatológicas.....	59
5.4.1	Histopatologia do baço	59
5.4.2	Histopatologia do intestino delgado.....	61
5.4.3	Altura das vilosidades intestinais	63
5.4.4	Profundidade das criptas intestinais.....	64
5.4.5	Relação Cripta/Vilosidade.....	65
5.5	Área de mucinas intestinais PAS positivas	65
5.6	Análise da área de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> imunomarcados.....	67
6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÕES.....	83
8.	REFERÊNCIAS	85
9.	ANEXOS.....	111

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Define-se infecção parasitária como a penetração, desenvolvimento ou multiplicação de um agente infeccioso no interior de outro organismo hospedeiro (FERREIRA *et al.* 2006). Em seres humanos, as infecções parasitárias acometem cerca de 300 milhões de pessoas, causando-lhes morbidades severas (OSTAN *et al.*, 2007), além de serem responsáveis por mais de um milhão de mortes anuais (MARIANO, 2014).

São inúmeros os prejuízos à saúde humana causados por infecções parasitárias, que vão desde à redução na qualidade de vida da população até disfunções graves em órgãos vitais (GIL, 2011; NEVES, 2011). Na população infantil, são responsáveis pelo baixo rendimento escolar e cognitivo (BERKMAN *et al.*, 2003; NIEHAUS *et al.*, 2002). No contexto econômico, as doenças parasitárias conduzem a prejuízos relevantes, uma vez que contribuem para aposentadorias precoces, gastos com medicamentos, consultas e internações, e, conseqüentemente, limitam a força motriz humana de trabalho e a geração de riquezas de um país (NIEHAUS *et al.*, 2002; MARIANO, 2014).

No âmbito das doenças parasitárias, as intestinais assumem destaque pela sua importância epidemiológica e altas prevalências, principalmente em países em desenvolvimento, nos quais estão associadas às regiões de bolsões de pobreza, à ausência ou ineficiência de saneamento básico, hábitos higiênicos precários, más condições de moradia e, falta de acesso às informações sobre parasitoses e aos serviços de saúde. (WHO, 2005; MARIANO, 2014; GIL, 2016).

Segundo (GORDIS, 2000), a gravidade das infecções entéricas decorre ainda de uma série de fatores, que incluem a associação entre as variações genéticas dos parasitos, as condições ambientais e os estados nutricional e imunológico do hospedeiro para que se estabeleça a doença.

Dentre os enteropatógenos mais comumente encontrados parasitando o ser humano, o flagelado *Giardia lamblia* (sin. *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) se apresenta como um protozoário eucarioto importante no contexto de saúde pública mundial, sendo observados significativos quadros diarreicos e outros comprometimentos em adultos e crianças (THOMPSON, 2000; KOOT *et al.*, 2009).

Nas infecções por protozoários entéricos, as crianças, as gestantes e os indivíduos imunodeficientes são relatados como grupos de maior vulnerabilidade (SAVIOLI *et al.*, 2006). Em crianças, ocorrem cerca de 58 milhões de casos de diarreia associada às infecções por protozoários intestinais, com geração de custos estimados em 150 milhões de dólares anuais (WHO, 1991).

Atualmente, a incidência mundial de indivíduos imunodeprimidos vem aumentando, em decorrência de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), com estimativas de 14.000 novos casos ocorrendo diariamente (BARSOU, 2006). Este contexto se torna preocupante, uma vez que a maioria das infecções pelo HIV acontecem em regiões do mundo onde o acesso ao tratamento é limitado, bem como são precárias as condições ambientais e de saneamento básico (STARK *et al.*, 2009).

Em contraste, em países desenvolvidos, a incidência de indivíduos imunossuprimidos aumenta em decorrência de intervenções médicas com terapias imunossupressoras cada vez mais agressivas, associadas aos tratamentos de doenças auto-imunes e hematopoiéticas, além de intervenções imunossupressoras para o transplante de órgãos, com estimativas de cerca de um milhão de órgãos transplantados anualmente (BACHUR *et al.*, 2008).

Em estudo conduzido por Boyd & Bachman (1982) demonstrou-se que amostras de fezes de pacientes soropositivos de diversas regiões do mundo, bem como em pacientes acometidos com imunodeficiências diversas, tais como hipogamaglobulinemia, Síndrome de Bruton e imunodeficiência comum variável, *G. lamblia* foi um dos protozoários mais frequentemente encontrado, sendo identificado como o agente causal de diarreia crônica nesses indivíduos. Em associação, crianças com Síndrome nefrótica que fazem uso de corticosteroides, pacientes que acometidos por desnutrição hipoproteica, Kwashiorkor-marasmático e linfoma, apresentaram risco significativamente maior de adquirir infecções por *G. lamblia* (NOURELDIN *et al.*, 1999).

No entanto, apesar da significância clínica encontrada em pacientes imunodeprimidos infectados por *G. lamblia*, alguns estudos demonstraram que a enterite causada por *G. lamblia* em indivíduos imunodeficientes não se difere da encontrada em pacientes imunocompetentes, com giardíase sintomática (ANGARANO *et al.*, 1997; MOOLASART, 1999). Tais controvérsias, aliadas aos escassos dados na literatura, à ambiguidade acerca da biologia e patogenia do parasito, à alta prevalência mundial da giardíase e ao aumento da incidência de pessoas acometidas com imunodeficiências diversas, tornam relevante a necessidade de mais investigações acerca do impacto da doença nesses indivíduos.

1.1 *Giardia*

1.1.1 Taxonomia e nomenclatura

No período de 1632-1723, o microscopista Antony van Leeuwenhoek, observou através de um microscópio óptico rudimentar, pequenos animáculos que se moviam numa amostra de seus próprios excrementos fecais. Esses seres foram primeiramente denominados por ele como “Pissabeds” – ele observou o movimento dos flagelos dos trofozoítos e pensou ser um organismo que possuía muitos ‘pés’ que se movimentavam ativamente – devido à sua semelhança, à primeira vista, com pequenos crustáceos isópodes das espécies *Oniscus asellus* e *Porcellio scaber* (DOBELL, 1920). Anos mais tarde, esses micro-organismos seriam classificados como pertencentes ao gênero *Giardia* (KUNSTLER, 1882).

Originalmente criado por Kunstler em 1882, o gênero *Giardia* passou por diversas modificações na nomenclatura do táxon ao longo do tempo, à medida em que os flagelados eram encontrados parasitando diferentes hospedeiros. A nomenclatura *Giardia*, passou a ser largamente adotada, a partir de um estudo com base na morfologia detalhada dos trofozoítos, realizada por Filice em 1952, o qual propôs três espécies como pertencentes ao gênero: *G. muris*, parasita de roedores, *G. duodenalis* (sinonímias: *G. lamblia* e *G. intestinalis*), encontrada no intestino delgado de mamíferos, e *G. agilis* como parasita de anfíbios (KUNSTLER, 1882; FILICE, 1952).

Atualmente, são pertencentes ao gênero, sete espécies, incluindo-se, além das três espécies citadas anteriormente: *G. psittaci* encontrada em periquitos (ERLANDSEN & BEMRICK, 1987), *G. ardae* em garças azuis (ERLANDSEN *et al.*, 1990a), *G. microti* em ratos-almiscarados (van KEULEN *et al.*, 1998) e a recém-descrita *G. peramelis*, parasita de marsupiais (ADAMS *et al.*, 2004). Dessas, somente a espécie *G. lamblia* é encontrada parasitando seres humanos, nos quais causa a doença conhecida como giardíase (THOMPSON, 2000).

O gênero *Giardia* se encontra classificado taxonomicamente, sob bases morfológicas, como pertencente ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae (MORRISON *et al.*, 2007). Entretanto, a sistemática atual, sob bases genéticas, morfológicas e bioquímicas, inclui o gênero no Filo Matomonada, Subfilo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Trepomonadea, Subclasse Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (CAVALIER-SMITH, 2003).

1.1.2 Variação genética

Embora se apresentem como protozoários morfológicamente simples, análises moleculares sugerem que a espécie *Giardia lamblia* seja na verdade um complexo de espécies, que abriga uma enorme variabilidade genética (MONIS *et al.*, 2003a). Até o momento, foram descritos oito assemblages (grupos) da espécie, subdivididos de “A” a “H”, agrupados em subassemblages (sub-grupos), a partir da caracterização de diferenças encontradas em genes de enzimas metabólicas, e em características morfológicas e ultra-estruturais dos trofozoítos e cistos (PLUTZER *et al.*, 2010).

As assemblages de *G. lamblia* se diferem significativamente umas das outras, demonstrando uma relação íntima quanto a preferência de hospedeiro (MONIS *et al.*, 2003a). Por muito tempo, afirmou-se que as assemblages “A” e “B”, que englobam quatro sub-grupos genéticos (I-IV) (ANDREWS *et al.*, 1989), apresentavam exclusiva especificidade com hospedeiros humanos, devido ao fato da infecção humana só ocorrer por meio de um parasitismo restrito a esses dois genótipos (ANDREWS *et al.*, 1989). Contudo, isolados pertencentes à assemblage “B” já foram recuperados de outras espécies de animais (MONIS *et al.*, 1999). Da mesma maneira, parasitos do sub-grupo genético “I”, pertencente à assemblage “A” já foram isolados tanto de hospedeiros humanos quanto de animais. Há ainda grandes variações dentro da assemblage “A”, onde se observa isolados especificamente restritos à hospedeiros humanos (sub-grupo II) e outros exclusivamente em animais (MONIS *et al.*, 2003b).

Vários hospedeiros, incluindo seres humanos, animais domésticos e de criação, bem como algumas espécies de vida selvagem já foram encontrados parasitados por genótipos em comum, inclusos nas assemblages “A” e “B” (THOMPSON, 2000). Tal fator se revela um indício do potencial zoonótico da giardíase, entretanto, a significância clínica da doença, nesse contexto, ainda não foi devidamente elucidada (PLUTZER *et al.*, 2010). As demais assemblages de *G. lamblia* (C-H) parecem assumir um caráter restrito a um hospedeiro de preferência. Sendo as assemblages “C” e “D” restritas à canídeos (HOPKINS *et al.*, 1997, 1999; MONIS *et al.*, 1998), “E” aos gados (animais de produção) (EY *et al.*, 1997), “F” em gatos domésticos e “G” em roedores, respectivamente (MONIS *et al.*, 1999). A assemblage “H”, por sua vez, descrita mais recentemente, foi isolada de focas marinhas (LASEK-NESSSELQUIST *et al.*, 2010).

1.1.3 Formas evolutivas

O protozoário *Giardia lamblia* se apresenta sob duas formas evolutivas: o trofozoíto (forma vegetativa) e o cisto (forma infectante).

1.1.3.1 Trofozoíto

O trofozoíto de *G. lamblia* (**Figura 1**) se apresenta como um micro-organismo unicelular, binucleado, com localização extracelular no hospedeiro, na porção do lúmen, que se mantém fortemente aderido à mucosa intestinal (SOLARI *et al*, 2003). É também a forma replicativa e vegetativa da giardíase, responsável pelas manifestações fisiopatológicas e clínicas da doença, embora não seja considerado um parasito invasivo de células e/ou tecidos (ALLAIN *et al.*, 2017).

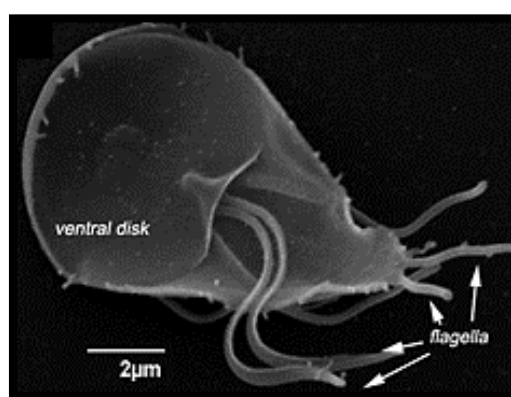
O corpo do parasito possui de 10 a 12 µm de comprimento, 5 a 7 µm de largura e 1 a 2 µm de espessura (GILLIN *et al*, 1996). Possui simetria bilateral e morfologia piriforme (formato de “pêra” ou “gota”), assumindo uma curvatura côncava dorso-ventralmente (NEVES *et al.*, 2011). A reprodução do trofozoíto é do tipo assexuada por divisão binária longitudinal, e a nutrição do mesmo ocorre por pinocitose através da membrana plasmática, tanto na face ventral quanto na dorsal, sendo as condições ótimas de desenvolvimento em cultura axênica mantida em estufa 37° C e o pH 7 a 7,2 (KEISTER, 1983).

A sustentação do corpo do trofozoíto ocorre por meio de um citoesqueleto que contém oito corpos basais, responsáveis por ancorar os quatro pares de flagelos (anterior, posterior, ventral e caudal) que emergem antero-lateralmente, postero-lateralmente e na região caudal, respectivamente, oriundos do corpo mediano e do disco ventral, próximos à linha média, em posição antero-ventral aos núcleos (ADAM, 1991; ANKARKLEV *et al.*, 2010).

O disco ventral, disco estriado ou ainda, disco adesivo, é uma estrutura rígida, côncava, formada por microtúbulos entrelaçados, que ocupa cerca de dois terços da superfície ventral do corpo do trofozoíto (ADAM, 1991). É talvez a estrutura mais importante para o parasito, encontrada somente no gênero *Giardia*. Tem como função principal, se aderir fortemente à mucosa intestinal de onde obtém os nutrientes necessários para o seu metabolismo. Além disso, possui um importante papel na sobrevivência do parasito, evitando que o mesmo seja eliminado durante o trânsito intestinal (ADAM, 2001; ALLAIN *et al.*, 2017).

Os corpos medianos são estruturas que se assemelham morfológicamente a um par de “garras” ou “vírgulas” associados às funções de biogênese do disco ventral, nucleação do parasito e reserva de microtúbulos (PIVA & BENCHIMOL, 2004). Essas estruturas são formadas por proteínas da família das tubulinas (α e β) e proteínas contráteis do citoesqueleto denominadas giardinas (presentes também no disco ventral) (FEELY *et al.*, 1982; CROSSLEY *et al.*, 1986).

No corpo do trofozoíto se observa, ainda, a presença de dois núcleos ovalados, diploides ($2 \times 2N$), idênticos morfológicamente e geneticamente, localizados na metade anterior da célula (SOLARI *et al.*, 2003). Também estão presentes organelas citoplasmáticas características de organismos eucariotos primitivos, tais como vacúolos lisossômicos, grânulos de glicogênio e ribossomais, e um aparato golgiense reportado em trofozoíto em processo de encistamento. Organelas típicas como mitocôndrias, peroxissomos, retículo endoplasmático liso e nucléolos não são observadas (ADAM, 1991).



Fonte: CERESA, B. Molecular Regulation of Endocytosis, 1. ed. 2012, cap. 11. 465p.

Figura 1 – Fotomicrografia do Trofozoíto de *G. lamblia* em posição ventral. Em evidência: o disco adesivo e os flagelos (setas).

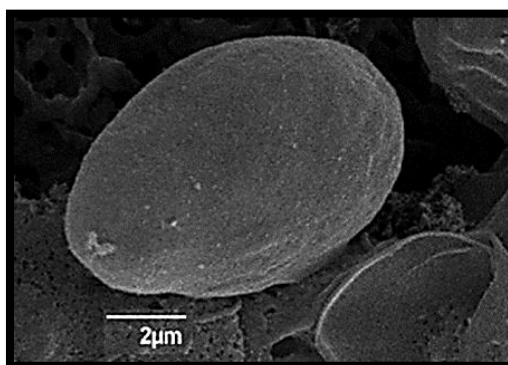
1.1.3.2 Cisto

O cisto de *G. lamblia* (**Figura 2**), é a forma infectante do parasito eliminada nas fezes de hospedeiros infectados e responsável pela propagação da doença. Possui morfologia elíptica característica, com medidas aproximadas de 8 a 12 μm de comprimento e 7 a 10 μm de largura. É envolto por uma fina parede cística de 0,3 a 0,5 μm de espessura, composta por uma membrana interna dupla que o isola das adversidades ambientais (ADAM, 2001).

A porção externa da parede cística é coberta por uma rede de 7 a 20 nm de filamentos (ERLANDSEN *et al.*, 1989;1990b), compostos por quatro grandes cadeias proteicas de 29, 75, 88 e 102 kDa de tamanho, que são proteínas originadas da parede do cisto, e componentes derivados do açúcar, que somam cerca de 60% dos carboidratos de composição da estrutura, a maioria β (1-3)-N-acetil-d-galactosamina (GalNAc) (ERLANDSEN *et al.*, 1990b).

No interior do cisto é possível observar dois ou quatro núcleos delimitados pela carioteca e ligados ao retículo endoplasmático, além de um número variável de fibrilas (ou axonemas de flagelos) que darão origem aos flagelos formados. Apresentam ainda fragmentos dos corpos medianos, em formato de vírgula, e outros fragmentos de disco, representando os primórdios do disco adesivo. Assim como nos trofozoítos, também estão presentes vesículas periféricas similares aos vacúolos lisossômicos (GIL, 2016).

Os cistos de *G. lamblia* são estruturas imóveis, relativamente inertes, com taxas metabólicas cerca de 80% menores do que as dos trofozoítos (ADAM, 2001). São resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis durante meses em águas com temperaturas entre 4 e 10 °C (WOLFE, 1992). São resistentes também à lise hipotônica, ao ácido gástrico (PAGET *et al.*, 1998; LUJAN & TOUZ, 2003) e à ação de cloro e desinfetantes, bem como de luz ultravioleta. A submissão dos cistos a um processo de ebulição é considerada uma eficiente forma de inativação dos mesmos. Por outro lado, já foi demonstrado que alguns deles sobrevivem dias sob congelamento em freezer convencional (ORTEGA & ADAM, 1997).



Fonte: CERESA, B. Molecular Regulation of Endocytosis, 1. ed. 2012, cap. 11. 465p.

Figura 2 – Fotomicrografia de varredura evidenciando o Cisto de *G. lamblia*.

1.1.4 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *G. lamblia* envolve apenas um hospedeiro, sendo classificado, portanto, como monoxeno, podendo ser reiniciado no mesmo indivíduo parasitado (auto-infecção externa) ou estendido a outros.

Inicia-se a partir da ingestão do cisto viável. O processo de infecção neste momento é relativamente fácil, pois pode resultar a partir da ingestão de apenas dez cistos (ORTEGA & ADAM, 1997). Uma vez ingerido, o cisto inicia um processo de excitação, por meio da ação das enzimas pancreáticas quimotripsina e tripsina, e pela exposição ao pH baixo do ácido gástrico, que juntos atuam pré-digerindo a parede cística. Este processo é ainda melhorado pela presença de múltiplos fatores, incluindo o aumento do pH e o contato com sais de bile primários, ambiente típico observado a partir da porção proximal do intestino delgado, a saber, o duodeno e início do jejuno (GILLIN, *et al.*, 1989).

No duodeno, fissuras nos pólos da parede cística permitem a emersão, primeiramente dos flagelos, seguido do corpo de uma forma intermediária denominada excizoíto. Cisteínas-proteases, oriundas das vesículas lisossômicas periféricas possuem um importante papel proteolítico durante a excitação, auxiliando na degradação de dentro para fora, da parede cística e otimizando a liberação do excizoíto. No interior do excizoíto recém-liberado, observa-se o aumento de suas atividades metabólicas e expressão gênica, que culminam na ativação de organelas e genes ligados à motilidade e à formação do disco adesivo dos trofozoítos. Finalmente, após alguns ciclos de replicação celular do excizoíto, são formados quatro trofozoítos vegetativos (ANKARKLEV *et al.*, 2010).

Os trofozoítos rapidamente se aderem aos enterócitos duodenais, via disco ventral e batimento dos flagelos, e iniciam o processo de replicação através de sucessivos ciclos de fissão binária, com o surgimento de uma nova geração a cada 6 a 12 h *in vitro* (ANKARKLEV *et al.*, 2010). Os parasitos colonizam, preferencialmente, as primeiras porções do intestino delgado, as criptas duodenais e a mucosa jejunal proximal. No íleo, região final do intestino, a escassez de colesterol e a exposição dos trofozoítos aos ácidos graxos, induzem ao processo de encistamento, nos quais se inicia a transformação das formas vegetativas móveis em cistos imóveis, infectantes (ORTEGA & ADAM, 1997; ANKARKLEV *et al.*, 2010).

As condições especiais do intestino delgado permitem a sobrevivência dos trofozoítos de *G. lamblia*, enquanto também atuam como gatilhos para o processo de

encistamento (GILLIN *et al.*, 1987). Ácidos graxos não-saturados são tóxicos para *G. lamblia*, enquanto que os saturados não apresentam toxicidade para os parasitos. A presença de sais de bile secundários reduz a toxicidade dos ácidos graxos e aumenta o pH intestinal através da ionização dos mesmos e de sua posterior transformação em micelas (HOFMANN & RODA, 1984). Deste modo, os sais biliares parecem atuar promovendo o encistamento por meio da blindagem dos ácidos graxos, impedindo os efeitos diretos dos mesmos sobre os trofozoítos de *G. lamblia* (GILLIN *et al.*, 1988).

Uma vez completo o processo de encistamento, os cistos são então conduzidos, via fluxo intestinal até o meio externo, onde são eliminados juntamente com as fezes, se tornando hábeis para infectar novos hospedeiros susceptíveis (ANKARKLEV *et al.*, 2010).

1.2 Giardíase

1.2.1 Importância e Epidemiologia

Desde as primeiras descrições dos protozoários do gênero *Giardia*, em meados do século XVII, discutia-se a existência da significância epidemiológica desses microorganismos, devido as dúvidas recorrentes quanto a sua efetiva patogenicidade (BUSATTI *et al.*, 2006). Entretanto, nas últimas décadas, a espécie *Giardia lamblia* vem despertando interesses científicos e clínicos pela frequência com que é relatada, e pelo desencadeamento de quadros de diarreia e má-absorção, especialmente em crianças e animais jovens, (THOMPSON, 2000; KOOT *et al.*, 2009; CARVALHO, 2011).

A maior prevalência da giardíase, infecção causada pela espécie *G. lamblia*, ocorre em pós-lactentes e pré-escolares (crianças de oito meses a dez anos de idade) e constitui, nessa população, um significativo problema no cenário de saúde pública, principalmente quando associada a quadros de desnutrição e imunodeficiências (GENDREL *et al.*, 2003; HARWOOD *et al.*, 2005; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2009; ROY *et al.*, 2011). Diante dessas condições, a doença pode contribuir de forma substancial para o desenvolvimento de sérios déficits físicos e cognitivos (NIEHAUS *et al.*, 2002; BERKMAN *et al.*, 2003; BUSATTI *et al.*, 2009; VENTURA, 2016), bem como outras sequelas a longo prazo (HANEVIK *et al.*, 2007; HALLIEZ & BURET, 2013).

A distribuição da giardíase é cosmopolita (**Figura 3**), sendo uma enteroparasitose presente tanto em países desenvolvidos (CDC, 2010) quanto nos países em desenvolvimento (DIB *et al.*, 2008), cujas prevalências variam entre 3-7% e 20-30%, nessas regiões,

respectivamente (RATANAPO *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2009; FLETCHER *et al.*, 2012). Estima-se que, ocorram cerca de 280 milhões de casos sintomáticos anuais em todo o mundo (LANE & LLOYD, 2002; ALIA & HILLA, 2003), além de 500.000 novos casos relatados a cada ano, na África, Ásia e América Latina (WHO, 2005). No entanto, infere-se que tais dados sejam subestimados, devido ao caráter negligente com que a doença, ainda hoje, é tratada.

A infecção por *G. lamblia* está associada a doença gastrointestinal grave (MARIANO, 2014), via rota fecal-oral, na qual ocorre a ingestão direta de fezes mediante contato com pessoas infectadas, ou água e alimentos contaminados com a forma infectante do parasito (forma cística) (ADAM, 2001; MONIS *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2013). A resistência do cisto permite que o mesmo seja mantido durante períodos prolongados no meio ambiente. Tal fator aliado à sua capacidade de propagação por reservatórios antroponóticos (THOMPSON & MONIS, 2012) e zoonóticos (FENG & XIAO, 2011), e à baixa dose infecciosa (10 a 100 cistos) (ARAUJO *et al.*, 2008), possibilitam que a infecção ocorra até mesmo em regiões providas de recursos sanitários (VENTURA, 2016).

Nos países desenvolvidos, *G. lamblia* é um dos parasitos intestinais mais comumente diagnosticados, com prevalências em torno de 0,4 a 7% (HORMAN *et al.*, 2004, CDC, 2010). Constitui-se a causa mais recorrente de surtos epidêmicos de diarreia relatados nos Estados Unidos (BALDURSSON & KARANSIS, 2011), sendo ainda, juntamente com *Cryptosporidium* spp. um dos agentes etiológicos mais frequentemente identificados, por mais de uma década, no país (MARIANO, 2014).

Estudos indicam que o desenvolvimento econômico-social de diferentes regiões do mundo parece estar relacionado à ocorrência ou não de sintomatologia, sendo os casos sintomáticos nas infecções por *Giardia* mais frequentes nos países em desenvolvimento, nos quais as infecções pelo protozoário costumam ser exacerbadas e prevalentes (MASON & PATTERSON, 1987; HOLLM-DELGADO *et al.*, 2008; SIWILA *et al.*, 2010).

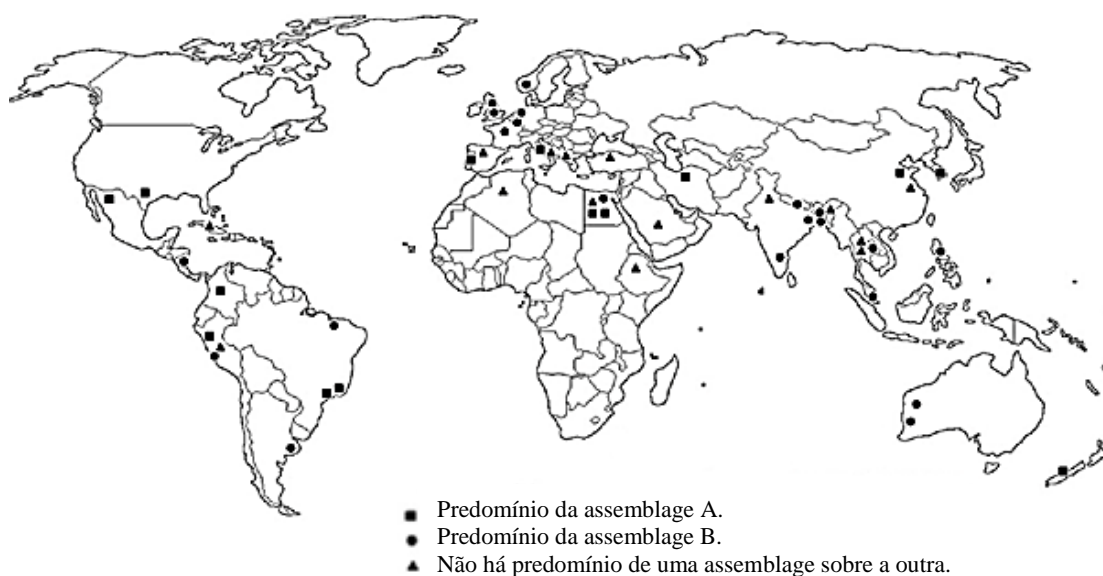
As altas taxas de prevalência da giardiase em países em desenvolvimento (1-60% em algumas regiões) são associadas, principalmente à precariedade ou ausência de saneamento básico (SAVIOLI *et al.*, 2006), condição que acomete cerca de um terço da população mundial, residente nessas regiões (MENEZES *et al.*, 2008). Acredita-se que a forma mais comum de transmissão de *G. lamblia* seja por meio do consumo de água não-tratada ou tratada de forma inadequada, contaminada com fezes humanas e/ou de animais infectados. Há relatos ainda, de transmissão a partir de coleções de água superficiais utilizadas para fins

recreativos (UNGAR *et al.*, 1984; FARTHING, 1989; GOLDIN *et al.*, 1990; CEDILLO-RIVERA *et al.*, 2009).

Apesar da escassez de estudos relacionando giardíase e indivíduos imunossuprimidos, alguns dados remetem à uma sintomatologia mais severa em grupos de pessoas que sofrem de comprometimentos imunológicos (FAUBERT, 2000; STARK *et al.*, 2009; SOLAYMANI-MOHAMMADI & SINGER, 2010). Estudos sobre giardíase em pacientes com imunodeficiência comum variável (IDCV) relatam que 60% das infecções de ordem gastrointestinal diagnosticadas nessa população, o parasito *Giardia lamblia* se apresentou como o agente infeccioso mais frequentemente identificado em cerca de 30% dos doentes que manifestavam quadros de diarreia crônica e má-absorção (CARVALHO, 2011).

Em pacientes imunodeprimidos em função de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Giardia lamblia* foi identificada como um dos enteropatógenos mais frequentes nas amostras fecais, com prevalências variáveis ao redor do mundo: 6,15% na Itália (BRANDONISIO *et al.*, 1999), 5,8% na França (COTTE *et al.*, 1993), 6% em Cuba (ESCOBEDO & NUNEZ, 1999), 1,5% na Coreia do Sul (GUK *et al.*, 2005), 3,8% na Etiópia (HAILEMARIAM *et al.*, 2004), 1,9% em Honduras (LINDO *et al.*, 1998), 8,3% na Índia (PRASAD *et al.*, 2000; MOHANDAS *et al.*, 2002), 1,5% na Austrália (STARK *et al.*, 2007), 5,3% no Irã (ZALI *et al.*, 2004), 1,9% em Uganda (BRINK *et al.*, 2002), 16% no Brasil (CIMERMAN *et al.*, 1999) e 17,7% em Los Angeles, Estados Unidos (ESFANDIARI *et al.*, 1997). No entanto, por razões desconhecidas, a giardíase não é considerada a principal causa de diarreia em pacientes infectados pelo HIV (ANGARANO *et al.*, 1997; STARK *et al.*, 2009).

Devido as altas taxas de prevalência e à emergência de *G. lamblia* em vários países ao redor do mundo, a giardíase foi incluída na Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS), em Setembro de 2004, por compor, juntamente com outros patógenos entéricos, um grupo de agentes causadores de doenças diarreicas, intimamente associadas às deficiências no saneamento básico, às regiões com bolsões de pobreza e ao consumo de água sem tratamento adequado (SAVIOLI *et al.* 2006; SMITH *et al.*, 2006; MARIANO, 2014).



Fonte: Laishram *et al.*, (2012).

Figura 3: Distribuição geográfica de *G. lamblia* ao longo do globo.

1.2.2 Manifestações clínicas e fisiopatológicas

Os eventos fisiopatológicos e clínicos nas infecções por *G. lamblia* são de ordem multifatorial e altamente variáveis entre os indivíduos, de modo que a fisiopatologia da doença permanece ainda não completamente elucidada (JIMENEZ *et al.*, 2004; COTTON *et al.*, 2011; ALLAIN *et al.*, 2017). Entretanto, diante do que já se conhece acerca da patogênese da giardíase, observam-se infecções cujo curso clínico varia de assintomático a manifestações sintomáticas agudas e crônicas (ADAM, 2001; COTTON *et al.*, 2011).

Quando presente, a sintomatologia clássica da giardíase ocorre cerca de 6-15 dias após a infecção, com durabilidade de 2-4 dias na fase aguda ou semanas na fase crônica (HAWRELAK, 2003; FONSECA, 2015). Se manifesta por meio de sinais clínicos como náuseas, vômito, desidratação, distensão e dor abdominal (geralmente pós-prandial) (GENDREL *et al.*, 2003), flatulência, perda de peso (ECKMANN, 2003), diarreia aquosa secretória com ou sem síndrome de má-absorção e esteatorreia (GENDREL *et al.*, 2003; BURET, 2008; COTTON *et al.*, 2011). Em infecções crônicas, pode culminar em má absorção de lipídeos (BANSAL *et al.*, 2005), vitaminas lipossolúveis (SAKI *et al.*, 2011), zinco e ferro (DEMIRCI *et al.*, 2003), vitamina B12, sódio (BURET, 2008) e ação reduzida

das funções das enzimas dissacaridases (SOLAYMANI-MOHAMMADI & SINGER, 2011).

Evidências sugerem ainda que, a severidade da sintomatologia pode diferir entre regiões oriundas de países não-industrializados e industrializados (MORKEN *et al.*, 2009; ROBERTSON *et al.*, 2010). Nesses últimos, são observados a maioria dos casos sintomáticos, manifestados através de disfunções de ordem gastrointestinal e, ainda, extra-intestinais que perpetuam-se mesmo após a resolução da infecção (COTTON *et al.*, 2011; 2014), como a síndrome do intestino irritável (COTTON *et al.*, 2011), doença celíaca (GENDREL *et al.*, 2003), urticária, reações alérgicas (FARTHING, 1993; DI PRISCO *et al.*, 1998) intolerância à lactose (GENDREL *et al.*, 2003) e alimentar (FINK & SINGER, 2017). As crianças sofrem consequências mais graves, estando sujeitas a quadros de anorexia (KOHLI *et al.*, 2008) e prejuízos no estado nutricional que podem gerar déficits em seu desenvolvimento físico e cognitivo (BERKMAN *et al.*, 2003).

Os fatores fisiopatológicos envolvidos na infecção por *G. lamblia* são dependentes principalmente da interação entre fatores do parasito (variação genética entre as cepas e carga parasitária) e do hospedeiro (faixa etária, dieta, microbiota endógena, resposta imunológica, estados nutricional e imune, hábitos e estilo de vida, e a ocorrência de co-infecções) (FARTHING, 1997; FAUBERT, 2000; SINGER & NASH, 2000; GIL, 2016), responsáveis pelos danos pontuais, às vezes severos, à arquitetura intestinal, que podem resultar ou não em aparecimento de manifestações clínicas (DI PRISCO *et al.*, 1998; TAKO *et al.*, 2013).

A adesão dos trofozoítos de *G. lamblia* ao epitélio do intestino delgado é o principal fator desencadeante das manifestações fisiopatológicas, e ocorre de maneira extracelular, sem que haja a invasão desses parasitos para as camadas sub-mucosa e adjacentes (COTTON *et al.*, 2011). A interação entre o tecido e as proteínas da superfície do parasito, principalmente α , β , δ , γ - giardinas (COTTON *et al.*, 2011) bem como produtos secretados e excretados pelo parasito, incluindo toxinas (CHEN, 1995) e substâncias de ação proteolítica (HARE *et al.*, 1989; WILLIAMS & COOMBS, 1995), desengatilham uma série de eventos que resultam, primariamente, em disfunções na arquitetura intestinal.

Dentre os eventos fisiopatológicos observados com frequência em indivíduos infectados por *G. lamblia*, incluem-se: hiperplasia de criptas, atrofia ou achatamento de vilosidades (ORTEGA & ADAM, 1997; KOOT *et al.*, 2009; FONSECA, 2015; VENTURA, 2016), aumento de linfócitos intraepiteliais (WRIGHT *et al.*, 1997; WRIGHT & TOMKINS,

1997; COTTON *et al.*, 2011) infiltração de granulócitos, linfócitos e plasmócitos na lâmina própria (MORSON & DAWSON, 2003) produção exacerbada de muco intestinal (ORTEGA & ADAM, 1997; FONSECA, 2015; VENTURA *et al.*, 2013; 2016), além da ocorrência de hiperplasia nodular linfoide relatada em pacientes adultos e em crianças (WARD *et al.*, 1983; WILLIAMS & WILKINS, 1999).

Ensaio *in vitro* demonstraram um aumento rápido na ativação de genes associados às vias das cascatas apoptóticas (caspases -3, -6, -8 e -9), tais como o complexo proteolítico asparato cisteína proteases (componente regulatório da morte programada de células), e altas taxas de apoptose de enterócitos, quando tais células são expostas a produtos (não identificados) secretados e/ou excretados por *G. lamblia*. (ROXSTROM-LINDQUIST *et al.*, 2005; COTTON *et al.*, 2011).

Demonstrou-se ainda, que a co-incubação *in vitro* de trofozoítos sonicados de *G. lamblia* e células duodenais humanas, causou a reorganização de proteínas componentes do citoesqueleto, em especial as F-actina e α -actina após 24 h de exposição (SCOTT *et al.*, 2002). *Giardia* também pode causar a reorganização das proteínas de junção ocludentes (ZO-1) e do complexo de junção apical composto primariamente por claudinas, por meio da diminuição da resistência elétrica transepitelial e de regulação gênica (CHIN *et al.*, 2002; COTTON *et al.*, 2011).

A combinação dos eventos relatados acima, resulta em hipersecreção de íons cloreto no lúmen, ruptura da função de barreira epitelial, translocação de macromoléculas via espaço paracelular, além de aumento na permeabilidade intestinal (TEOH *et al.*, 2000; BURET *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2002; TROEGER *et al.*, 2007), coincidentes com o pico de colonização dos trofozoítos na mucosa, sendo observado o retorno ao estado normal do intestino após a resolução da infecção (HARDIN *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 2002).

Análises de morfometria intestinal aliadas a técnicas de espectroscopia de impedância, demonstraram que pacientes com giardíase crônica apresentam menor área de superfície de absorção (TROEGER *et al.*, 2007). Tal mecanismo é ocasionado pela indução do encurtamento difuso das microvilosidades que compõem a borda em “escova” no epitélio intestinal (BURET *et al.*, 1990; 1992; SCOTT *et al.*, 2000, 2004), talvez relacionado à ação de linfócitos T CD8⁺ ativados (SCOTT *et al.*, 2004). Esta disfunção pode acontecer independente da ocorrência ou não da atrofia das vilosidades intestinais, que por sua vez, aparenta ser um evento isolado dependente de fatores ainda não esclarecidos, não sendo observado em todos os episódios de infecção por *G. lamblia* (CEVALLOS *et al.*, 1995;

OBERHUBER *et al.*, 1997; TROEGER *et al.*, 2007; BEHERA *et al.*, 2008; KOOT *et al.*, 2009; FONSECA, 2015; VENTURA, 2016).

Dentre os modelos experimentais utilizados para estudar os efeitos fisiopatológicos e a patogenia da infecção por *G. lamblia*, os gerbils (*Meriones unguiculatus*) permitem obter bons resultados devido ao seu tamanho, facilidade de manipulação, susceptibilidade à infecção e, principalmente, devido à semelhança entre o padrão da giardíase observado nesses animais com o dos seres humanos (ECKMANN, 2003; ARAUJO *et al.*, 2008).

O gerbil é um modelo já difundido em muitas partes do mundo e bem estabelecido para o estudo de doenças gástricas como a gastrite e o câncer de estômago induzidos pela infecção por *Helicobacter pylori* (KODAMA *et al.*, 2004; JÚNIOR *et al.*, 2016), doenças auditivas (ABBAS & RIVOLTA, 2015), e para o estudo da visceralização de *Leishmania major* (BAKIRCI *et al.*, 2015).

Estudos desenvolvidos no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais (LAPI) demonstraram que o gerbil é um bom modelo para o estudo de diversos aspectos da giardíase (GOMES *et al.*, 2012; BUSATTI *et al.*, 2013; VENTURA *et al.*, 2013; 2016; FONSECA, 2015; GIL, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2018), conforme corroborado em vários outros estudos (LEITCH *et al.*, 1989; FARTHING, 1997; VENKATESAN *et al.*, 1997; HARDIN *et al.*, 1997; FAUBERT, 2000; SCOTT *et al.*, 2000; 2004; HUMEN *et al.*, 2005; AMORIM, 2008; RIVERO *et al.*, 2010; TEJMAN-YARDEN *et al.*, 2013; QUIHUI-COTA *et al.*, 2014). O modelo permite ainda, a análise direta do intestino delgado, e das lesões e disfunções ocasionadas pela infecção por *G. lamblia* no órgão.

1.2.3 Permeabilidade intestinal

O trato gastrointestinal é um importante sítio de entrada de substâncias diversas pelo corpo. Além do alimento, transita pela região uma grande variedade de bactérias comensais, patógenos e, toxinas oriundas da alimentação e do metabolismo destes seres (AWAD *et al.*, 2017). Por esse motivo, o epitélio intestinal atua como uma efetiva barreira física que limita os micro-organismos e suas enterotoxinas do lúmen intestinal, ao mesmo tempo em que regula a passagem de íons e macromoléculas pela via paracelular (ANDRADE *et al.*, 2015; AWAD *et al.*, 2017).

A barreira epitelial do intestino é composta por uma monocamada de células epiteliais, mantidas firmemente aderidas por meio de uma rede protéica intercelular, o complexo “tight junction” (TJ) constituído de proteínas denominadas ocludinas, tricelulinas

e claudinas (COTTON *et al.*, 2011; AWAD *et al.*, 2017), que por sua vez, formam as junções firmes, os desmossomos e as junções gap (DAS *et al.*, 2012). O complexo TJ é regulado, em sua composição molecular, ultraestrutural e funcional por proteínas intracelulares e do citoesqueleto, sendo todo este conjunto de estruturas, crucial para a fisiologia das células epiteliais (AWAD *et al.*, 2017).

Danos à integridade do complexo TJ aumenta a condutância de íons através da via paracelular, resultando em um fenômeno de desregulação da permeabilidade intestinal, conhecido como intestino gotejante ou permeável (TOMITA *et al.*, 2004). Tal evento é o principal fator contribuinte para induzir a translocação de patógenos do lúmen e seus produtos para o interior do organismo, incluindo órgãos vitais (AWAD *et al.*, 2017), podendo culminar em consequências drásticas, como: i) má-absorção severa; ii) infecções sistêmicas; iii) inflamação crônica; iv) falência múltipla de órgãos e morte (BARBER *et al.*, 1991; WACHTLER *et al.*, 1995; SWANK & DEITCH, 1996; AWAD *et al.*, 2017).

A permeabilidade intestinal anormal se apresenta como um fator crítico na fisiopatologia gastrointestinal em várias condições clínicas, dentre elas, a artrite reumatoide, tratamentos com drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (BJARNASON *et al.*, 1995), nefropatia associada a IgA (DAVIN *et al.*, 1988), intolerância e alergias alimentares, má-absorção tropical (COOK & MENZIES, 1986) e doenças infecciosas (SMITH *et al.*, 1982; FORD *et al.*, 1985; NOONE *et al.*, 1985, LUNN *et al.*, 1999; SCOTT *et al.*, 2002; DAGCI *et al.*, 2002; TAFAZOLI *et al.*, 2003).

Infecções por patógenos podem desregular a função da barreira intestinal e, como consequência, aumentar a permeabilidade intestinal por diferentes mecanismos, incluindo a destruição direta ou a reorganização de proteínas específicas das TJ e do citoesqueleto celular, e ativação de eventos sinalizadores dos enterócitos (FASANO & NATARO, 2004). Há relatos de que alguns patógenos entéricos influenciam na função do TJ através da utilização das proteínas como receptores para internalização e consequente quebra da barreira epitelial (O'HARA & BURET, 2008).

A permeabilidade intestinal pode ser mensurada a partir de métodos que incluem a detecção de macromoléculas disponibilizadas via trato gastrointestinal, em diversos fluídos e excretas corpóreas (UNNO & FINK, 1998). Embora ainda não exista um método padrão para medir a integridade da mucosa do intestino, alguns ensaios já foram conduzidos para tal finalidade, utilizando modelos *in vivo* (OTAMIRI, *et al.*, 1987; FINK *et al.*, 1991;

HORTON, 1992; RYAN *et al.*, 1994), *ex vivo* (CARTER *et al.*, 1990; CIANCIO *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2018) e *in vitro* (SALZMAN *et al.*, 1995).

O uso do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o isótopo radioativo tecnécio-99m (^{99m}Tc) vem sendo cada vez mais difundido em estudos de permeabilidade intestinal. O ^{99m}Tc -DTPA é caracterizado como uma macromolécula que raramente atravessa a mucosa intestinal, exceto em casos de disfunções na barreira, nos quais o isótopo pode ser detectado em altas concentrações no sangue (JORGENSEN *et al.*, 2006; QUIRINO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2015).

Em (1990), Resnick e colaboradores estabeleceram uma maior eficácia no uso de ^{99m}Tc -DTPA em estudos de permeabilidade intestinal, em modelo para doenças do cólon (Doença celíaca e de Chron), em comparação à utilização do cromo-51 (^{51}Cr) EDTA, bastante estabelecido para estudos de permeabilidade sob as mesmas condições clínicas (CASELLAS *et al.*, 1986; BJARNASON *et al.*, 1995). O ^{99m}Tc -DTPA se mostrou mais vantajoso por demandar custos mais baixos e uma maior disponibilidade na seleção do material de interesse, devido às suas características radioativas (energia de raios gama, radionuclídeo, meia vida, e etc.) (CASELLAS *et al.*, 1986; RESNICK *et al.*, 1990; DAGCI *et al.*, 2002).

1.2.4 Resposta imunológica

As infecções por *Giardia lamblia* seguem um padrão de auto-resolução na maioria dos casos apresentados, o que remete à existência de uma imunidade protetora na giardíase (ECKMANN, 2003), seguindo evidências tais como: i) natureza autolimitante da infecção; ii) menor suscetibilidade à infecção apresentada por indivíduos oriundos de áreas endêmicas, quando comparados aos visitantes; iii) detecção de anticorpos sorológicos específicos anti-*Giardia* em indivíduos infectados; iv) participação de linfócitos na modulação da resposta imune; v) maior suscetibilidade e cronicidade da infecção em indivíduos imunocomprometidos (HEYWORTH *et al.*, 1987; LANGFORD *et al.*, 2002; OLMEZ *et al.*, 2014; GIL, 2016).

G. lamblia é um protozoário extracelular que normalmente não invade o epitélio (COTTON *et al.*, 2011) e por esse motivo, a resposta sistêmica local, quando ocorre, se manifesta de forma sutil (GIL, 2016). Os mecanismos da resposta imunológica inata na giardíase (**Figura 4**), incluem a barreira epitelial do intestino delgado constituindo a primeira linha natural de defesa, mucinas secretadas pelas células caliciformes intestinais, e

a secreção de peptídeos antimicrobianos pelas células epiteliais (CE's) (FINK & SINGER, 2017).

Evidências sugerem que as CE's são importantes produtoras de óxido nítrico (NO, do inglês nitric oxide) e utilizam como substrato para esse fim, a L-arginina e, como catalizadora, a enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês nitric oxide synthase). Em ensaios *in vitro* demonstrou-se que o NO contribui para a eliminação direta de *G. lamblia* por se apresentar como radical tóxico ao parasito, e, de forma indireta, promovendo o aumento do peristaltismo intestinal (ANDERSEN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2006; FINK & SINGER, 2017). As CE's também estão envolvidas na iniciação da resposta imune contra *Giardia* através da produção de quimiocinas, tais como CCXCL1-3, CCL2 e CCL20 (ROXSTROM-LINDQUIST *et al.*, 2005).

Interessantemente, os trofozoítos de *G. lamblia* utilizam a arginina para o seu metabolismo, o que reduz, dessa maneira, a produção de óxido nítrico sintase, propiciando assim a sobrevivência do parasito (STADELMANN *et al.*, 2012). Em adição, proteases secretadas/excretadas pelos trofozoítos são capazes de degradar algumas quimiocinas, incluindo CXCL8, atrativa de neutrófilos, como mecanismos de evasão imune (COTTON *et al.*, 2014).

A microbiota do intestino também pode ser caracterizada como participante da resposta imunológica do sistema de defesa inato do hospedeiro. Bactérias comensais apresentam um efeito inibitório sobre o crescimento e colonização do epitélio intestinal pelos trofozoítos de *Giardia*, por meio de competição, toxicidade direta e modulação da resposta imune, além de auxiliar na preservação da mucosa intestinal (BERRILLI *et al.*, 2012; GOYAL & SHUKLA, 2013).

Os trofozoítos de *G. lamblia* apresentam um extenso repertório com cerca de 200 genes homólogos que conferem uma diversificada variação de proteínas de superfície (VSPs, do inglês variant-specific surface proteins), que são expressas individualmente em momentos específicos (NASH *et al.*, 1990; NASH, 1997; ADAM, 2001). Tais variações antigênicas aparentam estar relacionadas a mudanças sutis nas moléculas ricas em cisteína e proteínas de membrana integral (NASH *et al.*, 1990), que recobrem a região externa do corpo do trofozoítos. Infere-se que esse seja o mecanismo mais importante de evasão da resposta do imune do hospedeiro, utilizado por *G. lamblia* (NASH *et al.*, 1990).

A conexão entre as respostas inata e adaptativa na giardíase é realizada por meio das células dendríticas localizadas na lâmina própria e nas placas de Peyer intestinais. Essas células expandem os seus dendritos até a superfície epitelial mucosa e captam antígenos de *Giardia* que em seguida são apresentados às células T naive por meio de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês major histocompatibility complex) de classe II (CARRANZA & LUJAN, 2010). A partir da ativação das células T são produzidas citocinas que modulam a resposta anti-*Giardia* (ANKARKLEV *et al.*, 2010).

Alguns estudos sobre resposta imune na giardíase demonstraram que as altas quantidades de anticorpos específicos anti-*Giardia* secretados no lúmen intestinal ou produzidos à nível sistêmico, em hospedeiros infectados, sejam imprescindíveis para a erradicação de *Giardia* (HEYWORTH, 1989; NASH *et al.*, 1997; FAUBERT, 2000; SNIDER & UNDERDOWN, 1986). Camundongos tratados com anticorpos anti-IgM, que apresentavam imunodeficiência ligada ao cromossomo X e por isso, eram deficientes quanto ao desenvolvimento de células B, desenvolveram a capacidade de eliminar o parasito *G. muris* após o tratamento com o anticorpo (SNIDER *et al.*, 1985; SNIDER & UNDERDOWN, 1988). Em associação, a depleção de células B por meio de genes marcados, evidenciou camundongos incapazes de resolver infecções por *G. muris* e por *G. lamblia* (STAGER & MULLER, 1997; LANGFORD *et al.*, 2002).

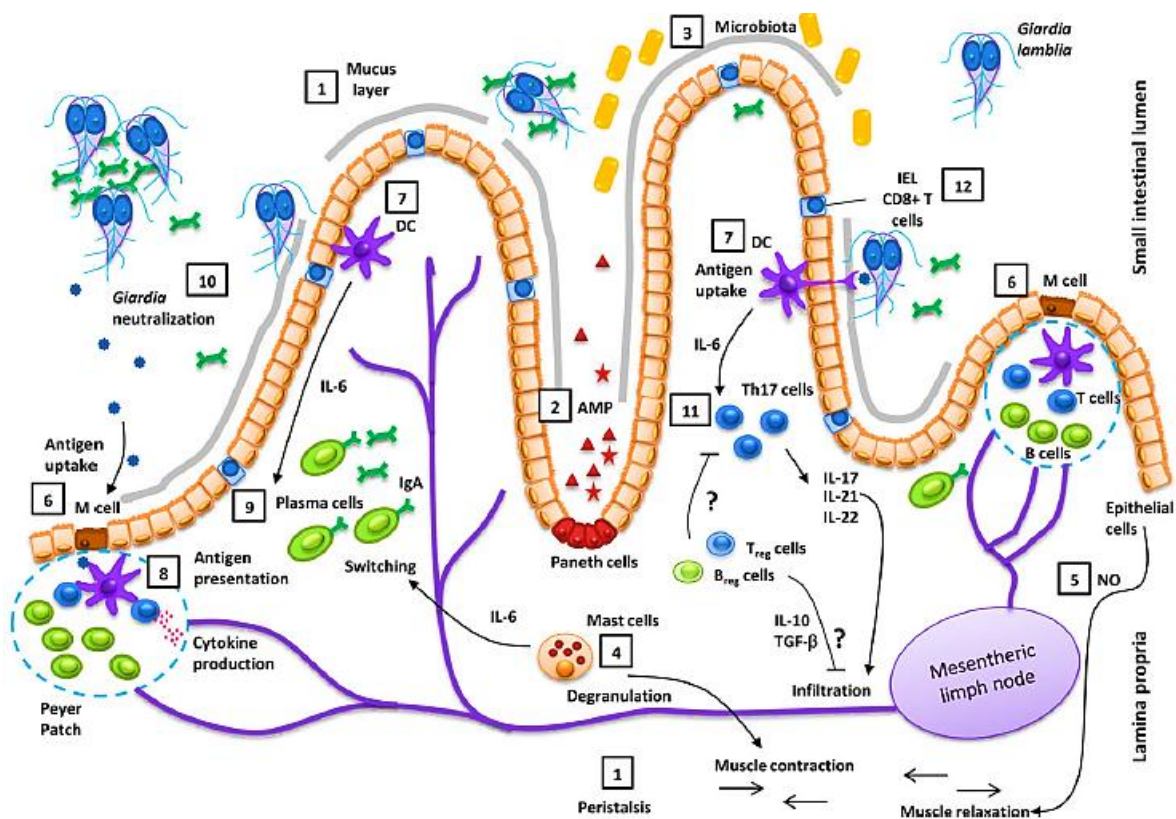
Por outro lado, o real papel das células B e dos anticorpos na giardíase se mostra altamente controverso na literatura, uma vez que outros estudos com camundongos deficientes para essas células, demonstraram animais capazes de eliminar o parasito com facilidade (HEYWORTH *et al.*, 1987; SINGER & NASH, 2000). As células T CD4+ já são estabelecidas como um grupo celular essencial para a eliminação de *Giardia*, promovendo um mecanismo imune dependente de células T, porém, sem qualquer relação com os anticorpos. É possível que os anticorpos exerçam uma função mais efetiva durante a fase crônica da infecção. (SINGER & NASH, 2000).

As células TCD4+ são produtoras de citocinas específicas a depender do contexto da resposta imunológica requerido. No mecanismo imune de perfil Th1 é produzida principalmente a citocina (IFN)-g enquanto que no Th2 são produzidas, dentre outras, a citocina IL-4. Ambas as citocinas são encontradas em abundância no soro de pacientes humanos infectados por *Giardia* (BAYRAKTAR *et al.*, 2005; MATOWICKA-KARNA *et al.*, 2009), entretanto, as respostas Th1 e Th2 aparentemente não apresentam significância absoluta na resolução da giardíase, uma vez que camundongos deficientes para IFN-g e IL-

4 se mostraram capazes de eliminar o parasito sem grande dificuldade (SINGER & NASH, 2000).

A citocina IL-6 apresenta-se, aparentemente, como a principal citocina expressa em infecções por *Giardia*, indispensável não somente para o controle do parasito, mas também para a proteção da mucosa intestinal. Recentemente, observou-se que a IL-6 secretada por mastócitos presentes no infiltrado intestinal é uma molécula crítica para o desenvolvimento de células pro-inflamatórias Th17, relacionadas à resposta imunológica protetiva na giardíase (SINGER, 2015). Entretanto, melhores estudos necessitam ser realizados para elucidar o suposto envolvimento da resposta Th17 na imunopatologia de doenças crônicas pós-infecção por *Giardia*, tais como a Síndrome do intestino irritável e colite ulcerativa em alguns indivíduos (HANEVIK *et al.*, 2017).

Outros subtipos de células T, tais como as CD8⁺ parecem não ser requeridos para a resolução das infecções por *Giardia*, inclusive, estão diretamente envolvidas na redução da atividade das dissacaridasas intestinais por contribuir para a danificação das microvilosidades (SINGER & NASH, 2000). Os linfócitos intra-epiteliais CD8⁺ são largamente aumentados na giardíase e se apresentam como as principais células causadoras das lesões na mucosa durante a infecção (COTTON *et al.*, 2011; 2014).



Fonte: adaptado de Lopez-Romero *et al.*, 2015.

Figura 4: Mecanismos de defesa do hospedeiro contra a *G. lamblia*.

Mecanismos da imunidade inata são a primeira linha de defesa contra a colonização de *Giardia*: a camada de muco na superfície intestinal e os movimentos peristálticos constituem barreiras mecânicas que limitam a fixação dos trofozoítos (1). Peptídeos antimicrobianos (AMP) sintetizados pelas células de Paneth podem eliminar os trofozoítos (2). A microbiota do intestino possui um efeito anti-*Giardia* por competição, toxicidade direta ou modulando a resposta do sistema imune. Além disso, a microbiota contribui para preservar a integridade do epitélio intestinal (3). Os mastócitos liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6 e promove o peristaltismo (4). Enterócitos e células do sistema imune produzem óxido nítrico (NO) que tem um efeito citostático nos trofozoítos (5). As células dendríticas podem expandir seus dendritos para o lúmen intestinal e capturar os antígenos para posteriormente apresentá-los, através de moléculas MHC de classe II, às células T naíve (linfócitos T naíve) e induzir a resposta imune (6, 7). As células T ativadas liberam citocinas que modulam a resposta anti-*Giardia* (8). A IL-6 liberada por mastócitos, as células dendríticas e as células T são importantes para a modulação da resposta humoral e maturação das células B, que se diferenciam em plasmócitos para produzirem IgA (9). Os plasmócitos migram para lâmina própria e liberam IgA, o que pode inibir a *Giardia* de aderir nas células epiteliais do intestino (10). Células Th17 e células T CD4+ são ativadas durante a imunidade adaptativa inicial contra *Giardia* e liberam citocinas, tais como IL-17, IL-21, IL-22, as quais desempenham um papel pró-inflamatório (11). Linfócitos intra-epiteliais (IEL) são as principais células T CD8+ intestinais e desempenham um papel patológico no intestino durante a giardíase (12).

1.3 Terapia imunossupressora

Define-se imunossupressão como o ato de reduzir deliberadamente a atividade ou eficiência do sistema imunológico (REZENDE, 2011). A imunossupressão ocorre, usualmente, quando há a necessidade de realização de procedimentos, tais como transplantes de órgãos, ou para o tratamento de doenças que promovem a exacerbação inapropriada da resposta imune contra antígenos próprios do organismo, as chamadas: doenças auto-imunes (CZOCK *et al.*, 2005; GHARAGOZLOO *et al.*, 2015).

O ato de submeter um indivíduo à terapia imunossupressora é realizado, normalmente, utilizando-se de fármacos capazes de suprimir ou reduzir as respostas imunológicas, bloqueando o efeito de citocinas pró-inflamatórias, e a ativação e migração de células T específicas, ou até mesmo levando a diminuição no número de leucócitos circulantes (GHARAGOZLOO *et al.*, 2015). Existem ainda, outros métodos imunossupressores que podem ser utilizados para esses mesmos fins, como a plasmáfereze, a radiação, e o uso de moléculas nanomedicinais (REZENDE, 2011; GHARAGOZLOO *et al.*, 2015).

1.3.1 Glicocorticoides

Os glicocorticoides, comumente denominados corticosteroides, glicocorticosteroides ou simplesmente esteroides, são hormônios sintetizados naturalmente e liberados pela glândula supra-renal sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) circulante, secretado na adenohipófise (RANG & DALE, 2012).

O uso farmacológico dos glicocorticoides remota há mais de 30 anos, sendo usados de maneira intensa e frequente na prática clínica, ainda hoje, em diversas aplicações. Devido ao efeito pleiotrópico destes fármacos, são considerados os medicamentos anti-inflamatórios mais prescritos e eficazes atualmente disponíveis, envolvidos em vários aspectos da resposta fisiológica (FALKENSTEIN *et al.*, 2000; CZOCK *et al.*, 2005). São capazes de se ligar a receptores específicos, transcritos por fatores intracelulares, de modo a exercer efeitos positivos e/ou negativos na expressão de genes-alvos (BEATO *et al.*, 1989; 1996).

À nível sistêmico, a terapia corticóide promove profundos efeitos no organismo devido à ação antimetabólito imunossupressora de alguns fármacos, que pode ser potencialmente tóxica a órgãos vitais, tais como os rins e o trato gastrointestinal, além de causar alterações na fisiologia neuronal e hematológica (GHARAGOZLOO *et al.*, 2015). A

desativação do sistema imunológico, pode ainda, agravar as manifestações clínicas de algumas infecções parasitárias, tornar o paciente vulnerável às diversas infecções oportunistas, bem como dificultar o controle e erradicação dos agentes patogênicos (REZENDE, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da comprovada importância da giardíase como entidade mórbida que atinge significativa parcela da população do mundo, não se sabe até o momento quais são os reais impactos da doença, que implicam em diarreia aguda ou crônica, dentre outras sequelas à longo prazo, em alguns grupos específicos de vulnerabilidade.

Indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos são relatados como hospedeiros sintomáticos crônicos de giardíase. A infecção por *G. lamblia*, nesses pacientes, pode resultar em severidade da doença, progressão para estágios crônicos e surgimento de outras anormalidades, dificuldades em promover a cura ou o controle da infecção, além de maior disseminação do parasito. No entanto, alguns portadores de disfunções de ordem imunológica, acometidos com a parasitose, apresentam um curso infeccioso sem grandes complicações, o que torna o entendimento da patogenia da doença ainda mais obscuro.

Atualmente, registra-se um aumento significativo na incidência de indivíduos imunocomprometidos, seja por acometimento de infecções pelo HIV ou por intervenções terapêuticas imunossupressoras para o tratamento de doenças auto-imunes e transplantes de órgãos. Concomitantemente, a prevalência mundial da giardíase se mantém elevada, nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o que torna viável a sobreposição de ambos os contextos patológicos. As doenças diarreicas, nesse cenário, podem prejudicar o curso do tratamento e contribuir para o declínio abrupto da condição clínica do paciente.

Sendo assim, as controvérsias no âmbito clínico, aliadas aos escassos dados na literatura, à ambiguidade acerca da patogenia do parasito, e ao risco eminente de infecções crônicas por *G. lamblia* em pacientes imunossuprimidos, tornam relevante a necessidade de mais investigações acerca dos fatores que podem contribuir para as disfunções intestinais, e, conseqüentemente manifestações clínicas mais severas observadas nestes indivíduos, em detrimento de hospedeiros sob outros contextos epidemiológicos.

Portanto, neste trabalho, buscou-se contribuir para a elucidação do assunto, por meio da avaliação da permeabilidade do intestino delgado e da análise histopatológica e morfométrica intestinal em gerbils experimentalmente imunossuprimidos e infectados por *G. lamblia*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da infecção por *Giardia lamblia* no intestino delgado de gerbils, associado ou não à imunossupressão.

3.2 Específicos

- Avaliar o impacto da infecção por *G. lamblia* na permeabilidade intestinal de gerbils imunossuprimidos ou não;
- Realizar análise histopatológica do baço e do intestino delgado de gerbils infectados ou não por *G. lamblia*, imunossuprimidos ou não;
- Realizar análise morfométrica das vilosidades e criptas intestinais de gerbils infectados ou não por *G. lamblia*, imunossuprimidos ou não;
- Realizar análise morfométrica das áreas de mucinas intestinais de gerbils infectados ou não por *G. lamblia*, imunossuprimidos ou não;
- Realizar análise morfométrica do parasitismo intestinal de gerbils infectados por *G. lamblia*, imunossuprimidos ou não.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados gerbils, da espécie *Meriones unguiculatus* com 4-6 semanas de idade, de ambos os sexos, obtidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFG. A manutenção dos animais ocorreu no Biotério do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais (LAPI), de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para garantir a segurança dos mesmos. O controle da temperatura e do fotoperíodo de 12/12h foram realizados, e os animais obtiveram acesso *ad libitum* para água e ração comercial.

Todos os animais receberam tratamento com o antihelmíntico Ivermectina (Vitamedic Indústria Farmacêutica Ltda) 1% antes do início do experimento, em quarentena, durante cinco dias. A solução foi administrada via subcutânea, na dose 0,1mL/animal, para assegurar que os roedores estivessem livres de outras possíveis parasitoses. Amostras de fezes foram coletadas diariamente e analisadas pelo método de Ritchie durante o tratamento com o fármaco. Somente os gerbils livres de patógenos específicos foram selecionados para experimentação. Todos os procedimentos foram aprovados e conduzidos em concordância com as diretrizes do CEUA/UFG N° 254/2016 (**Anexo 1**).

4.2 Delineamento experimental

Utilizou-se 35 gerbils subdivididos em quatro grupos experimentais contendo nove ou oito animais em cada, a saber:

- **GRUPO CONTROLE (CT):** animais imunocompetentes não-infectados.
- **GRUPO CONTROLE-INFECTADO (CTIn):** animais imunocompetentes infectados com *G. lamblia*.
- **GRUPO IMUNOSSUPRIMIDO (IM):** animais imunossuprimidos e não-infectados.
- **GRUPO IMUNOSSUPRIMIDO-INFECTADO (IMIn):** animais imunossuprimidos e infectados com *G. lamblia*.

Os animais de todos os grupos receberam uma marcação com ácido pícrico (10%), em regiões distintas do corpo, com o intuito de permitir a identificação individual de cada um. Em seguida, foram redistribuídos em gaiolas coletivas.

Iniciou-se o período experimental a partir da indução de imunossupressão nos animais dos grupos IM e IMIn, por meio de terapia corticoide. Esse processo ocorreu a partir do primeiro dia experimental, continuamente, até o dia 25. Para a verificação do estado imunossuprimido, foram realizados leucogramas antes (dia 1) e após o período experimental (dia 25), nos respectivos grupos.

A infecção experimental por *G. lamblia* nos grupos CTIn e IMIn ocorreu no dia 11, concomitantemente ao tratamento imunossupressor no grupo IMIn. Os roedores permaneceram infectados durante 14 dias.

No vigésimo-quinto dia experimental, realizou-se a eutanásia dos animais de todos os grupos, seguida da coleta dos tecidos de interesse. Nesse dia também ocorreu a medição da permeabilidade intestinal dos gerbils. As amostras biológicas obtidas foram processadas para análises histopatológicas e morfométricas.

Todo o experimento foi realizado no período total de 30 dias, a contar do tempo destinado à aclimação, tratamento com vermífugo, acondicionamento dos animais, imunossupressão, infecção e eutanásia. (Figura 5).

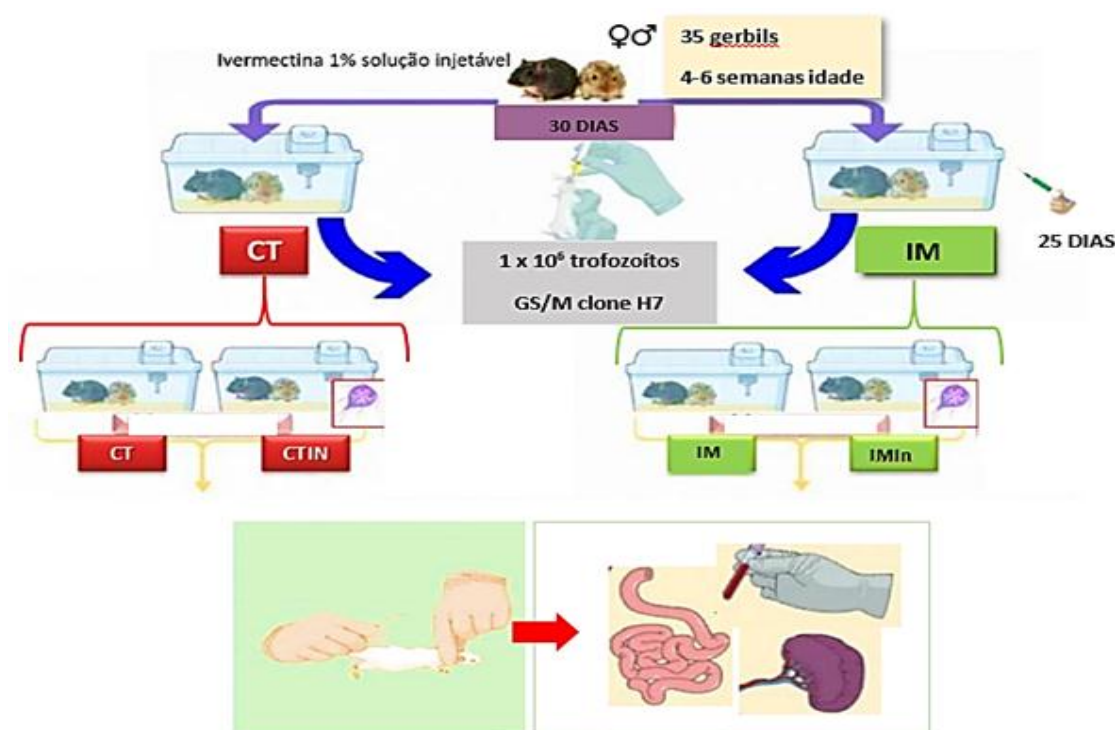
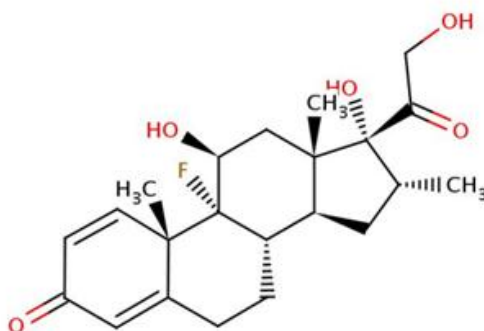


Figura 5 – Fluxograma representativo do delineamento experimental utilizado neste trabalho.

4.3 Imunossupressão

Utilizou-se para a indução de imunossupressão nos gerbils dos grupos IM e IMIn, o glicocorticoide Dexametasona (DEX) sob a forma farmacêutica de fosfato dissódico de dexametasona (Decadron® 4mg/ml, Prodome - Brasil), solução injetável. A administração da DEX se deu por via intramuscular, diariamente, durante 25 dias. A posologia escolhida foi de 5 mg/Kg/animal, considerando-se o peso médio do animal (50g). Aplicou-se 0,125 µL da droga/animal, diluída em água destilada.

A Dexametasona (**Figura 6**) é classificada, de acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), como (8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R, 17R) - 9-fluoro - 11, 17 - dihidroxi - 17 - (2 - hidroxiacetil) - 10, 13, 16 - trimetil - 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16 octa - hidrociclopenta [a] fenantreno - 3 - ona, sendo sua fórmula molecular $C_{22}H_{29}FO_5$. Possui meia vida variante entre 36 e 54 h e a dose letal média referente à administração por via oral em camundongos é de 6500 mg/Kg (MATTI, 2009).



Fonte: DrugBank, 2018.

Figura 6: Fórmula estrutural da Dexametasona.

4.3.1 Leucograma

Para a verificação do estado imunossuprimido dos animais tratados com DEX, realizou-se a contagem de leucócitos circulantes por meio da realização de leucogramas. Coletou-se o sangue periférico dos gerbils dos grupos CT e IM por meio de punção da veia caudal, em tubo contendo EDTA (microcoleta – 0,5mL), de acordo com (GIL, 2016). Esse processo ocorreu da seguinte maneira: realizou-se um leucograma antes do início do tratamento com DEX (Dia 1) e outro após o tratamento com DEX (Dia 25), seguido das contagens total (CDL) e diferencial (CTL) de leucócitos circulantes, ao final de cada procedimento.

Uma alíquota foi utilizada para realização da CTL em câmara de Neubauer. Para a realização da CDL, cerca de 3 µL de sangue foram preparados para realização do esfregaço que foi corado utilizando o kit Panótico rápido, e a contagem das células foi realizada em microscópio óptico (Olympus BH2 - Japan).

Até o momento, não há na literatura valores padrões de referência para gerbils. Os padrões leucocitários de roedores se apresentam altamente variáveis a depender da idade, sexo, variação genética, dieta, condições ambientais, e nível de estresse em que os animais foram submetidos durante o procedimento de coleta de sangue, podendo influenciar na celularidade circulante (CLSI, 2000).

Portanto, os valores de referência leucocitários dos gerbils, para esse estudo, seguiram o critério de análise da celularidade circulante antes do início do tratamento imunossupressor e após o tratamento, comparando o animal a ele próprio, sob diferentes circunstâncias (tratamento ou não) e tempo (dia 1 e dia 25). Os animais que apresentaram significativa redução no número de leucócitos circulantes ($p < 0,05$) ao final do tratamento imunossupressor, foram considerados imunossuprimidos.

4.4 Ajuste do inóculo e infecção experimental por *Giardia lamblia*

Foram utilizados para a infecção experimental trofozoítos da cepa GS/M-clone H7 (ATCC 50581) da espécie *G. lamblia* – genótipo B, oriundos do LAPI. O cultivo dos parasitos foi realizado em cultura axênica em meio TYI-S-33 (DIAMOND, 1978), modificado por (KEISTER, 1983) suplementado com bile bovina, em pH 7, submetido à esterilização em filtro Seitz 0.22 µm. Repiques foram realizados a cada 72h, sendo os tubos posicionados a uma inclinação de 30°, em estufa bacteriológica a 37° C (FONSECA, 2015).

Para a realização do inóculo, os tubos de cultura contendo os trofozoítos foram imersos em banho de gelo por 25 minutos, com o intuito de desprender os parasitos da parede dos tubos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. A partir do pellet obtido, à 40 µL contendo trofozoítos de *G. lamblia*, adicionou-se 360 µL de eosina (corante vital 0,125%) em um microtubo, na diluição 1:10. Após homogeneização da solução, realizou-se a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer (FONSECA, 2015; VENTURA, 2016).

O pellet estoque, contendo trofozoítos, foi novamente ressuspendido em meio de cultura TYI-S-33 na concentração final de 1×10^6 trofozoítos de *G. lamblia*. Os animais dos grupos CTIn e IMIn foram inoculados, respectivamente, via gavagem orogástrica através de

uma cânula DELVO nº 15 acoplada a uma seringa de 1mL. Cada gerbil recebeu 0,8mL de solução contendo 1×10^6 trofozoítos de *G. lamblia*, conforme (FONSECA, 2015; VENTURA, 2016).

4.5 Estudo da permeabilidade intestinal

4.5.1 Marcação do DTPA com ^{99m}Tc

Para marcação do DTPA com ^{99m}Tc foi utilizado um reagente liofilizado composto por 10mg de DTPA e 0,5mg do agente redutor cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). A solução foi reidratada com 1mL de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), obtidos de um gerador de $^{99}\text{Molibdênio}/^{99m}\text{Tecnécio}$ (IPEN/CNEN, São Paulo), contendo uma atividade de 185 MBq de ^{99m}Tc . A preparação foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos (COSTA *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2015). Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia/UFMG.

4.5.2 Medição da permeabilidade intestinal

Para a medição da permeabilidade intestinal, os animais de todos os grupos receberam via gavagem orogástrica 0,1 mL de solução de ^{99m}Tc -DTPA contendo 18,5 MBq de atividade. O padrão de dose correspondente a uma alíquota de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA oferecido aos animais, foi utilizado para correção do decaimento radioativo do ^{99m}Tc e teve a radioatividade determinada em tempo igual aos demais tubos (ANDRADE *et al.*, 2015).

Após 4 horas de administração do isótopo, os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (5%) e Xilazina (2%) na dosagem de 0,08 $\mu\text{l}/\text{animal}$ injetada intraperitonealmente. Em seguida, realizou-se a coleta do sangue via veia cava inferior para a medição de radioatividade em contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3) e determinação da permeabilidade intestinal (ANDRADE *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em percentual da dose por g de sangue (ANDRADE *et al.*, 2015), por meio da fórmula abaixo:

$$\% \text{ dose/g sangue} = \frac{\text{contagens por minuto g/sangue}}{\text{contagens por minuto padrão de dose}} \times 100$$

4.6 Obtenção das amostras biológicas para análise

Para a realização do procedimento de eutanásia, os animais foram previamente submetidos a jejum de 12 horas para esvaziamento do conteúdo luminal e coleta dos tecidos (sangue, intestino e baço). No dia seguinte, os animais de todos os grupos foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal contendo uma solução de Ketamina (5%) e Xilazina (2%) na posologia de 0,08 µL/dose/animal.

Realizou-se a coleta do sangue via veia cava inferior (ANDRADE *et al.*, 2015), e, em seguida, eutanásia (deslocamento cervical). Foi realizada incisão mediana para abertura da cavidade peritoneal e localização das vísceras. O intestino delgado foi inteiramente coletado (~18 cm) e dividido em três porções semelhantes. Aproximadamente 4 cm da porção proximal duodenal foi encaminhada para processamento de cortes histológicos. O baço foi extraído inteiramente, e em seguida, fixado em formol (10%) para processamento histológico.

4.6.1 Carcaças contendo material radioativo

As carcaças contendo material radioativo foram depositadas em caixas de chumbo e submetidas aos processos de descontaminação em autoclaves específicas, até que ocorresse o decaimento da radioatividade aos níveis ambientais. Em seguida, as carcaças foram armazenadas em freezer próprio para materiais radioativos, presente no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia/UFMG, até a devida coleta pelo serviço de limpeza da unidade.

O procedimento foi realizado em concordância com a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) Resolução 014/89 – Norma experimental 6.05. Registro de manejo de radioativos: AL0603, Licença: Valbert Nascimento Cardoso.

4.7 Análises histopatológicas

A porção duodenal coletada, conforme descrito no item 4.6, foi cortada longitudinalmente com auxílio de tesoura e pinça, e enrolada em formato de espiral sob fixação em solução Bouin (2%) onde permaneceu por 24 horas. Posteriormente, os fragmentos foram adicionados à uma solução de formol tamponado (10%) pH 7,2. O baço foi extraído inteiramente e adicionado em solução de formol tamponado (10%), seguido de processamento para análise histopatológica de forma semelhante ao tecido intestinal.

Para a confecção de lâminas histológicas, os fragmentos de duodeno e o baço foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina para a obtenção de cortes histológicos com 4-5 μm de espessura (FONSECA, 2015; GIL, 2016; VENTURA, 2016). As lâminas contendo cortes histológicos foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para análises de morfometria intestinal. Todo esse processo foi realizado no Laboratório de Técnicas Histopatológicas e no Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG.

As análises qualitativas das lâminas histológicas de intestino delgado e baço coradas com H&E e PAS, bem como as pranchas fotográficas de H&E, foram realizadas em colaboração com a Prof^a. Dra. Denise Carmona Cara Machado do Departamento de Morfologia – ICB/UFMG. Utilizou-se como critério de análise, o sistema de escore histológico discriminado na **Figura 7**.

ESCORE HISTOLÓGICO	
GRAU DE LESÃO	MUCOSA DUODENAL
0	Mucosa com características dentro dos padrões de normalidade.
1	Mucosa apresentando discreto edema e/ou dilatação do vaso galactóforo. Observa-se pouco ou nenhum infiltrado inflamatório.
2	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório de discreto a moderado, sem lesão dos enterócitos. Diminuição das vilosidades intestinais em 10%.
3	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório moderado podendo aparecer erosões pontuais. Diminuição do tamanho das vilosidades intestinais em 25%. Discreto infiltrado na submucosa.
4	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório moderado podendo aparecer erosões pontuais. Diminuição do tamanho das vilosidades intestinais e hiperplasia das criptas em 25%. Infiltrado na submucosa de discreto a moderado.
5	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório de moderado a grave, podendo aparecer erosões e úlceras. Diminuição do tamanho das vilosidades intestinais e hiperplasia das criptas em 50%. Infiltrado na submucosa de moderado a grave. Hipertrofia discreta da camada muscular.
6	Mucosa apresentando infiltrado inflamatório grave, áreas com úlceras. Diminuição do tamanho das vilosidades intestinais e hiperplasia das criptas maior que 75%. Infiltrado na submucosa grave. Hipertrofia da camada muscular mais acentuada.

Figura 7 – Escore histológico para caracterização das lesões histopatológicas na mucosa duodenal de gerbils.

4.8 Morfometria da mucosa intestinal

Os cortes histológicos corados com H&E foram visualizados por meio da objetiva de 20x do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) para a digitalização aleatória de vilosidades (n=30) e criptas intestinais (n=30) por meio da microcâmera Samsung SCD-415ND (Samsung, Seul, South Korea). A altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais foram calculadas com auxílio do software KS300 (Carl Zeiss, Germany). Posteriormente, foi realizado o cálculo da razão profundidade das criptas/altura das vilosidades. A determinação da base das vilosidades foi realizada manualmente por meio de ferramentas do software. (CALIARI, 1997).

Para o cálculo da área de produção de mucinas nas vilosidades intestinais, a saber, áreas PAS positivas (PAS⁺), foram utilizados os cortes histológicos corados com PAS. As

lâminas foram visualizadas pela objetiva de 40x em microscópio Axiolab para a digitalização aleatória de 25 imagens intestinais, conforme descrito anteriormente. 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 mucina em μm^2 (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O imageamento microscópico, segmentação de imagens, processamento digital e definição das condições de morfometria foram realizados em concordância com CALIARI (1997).

4.9 Reação imuno-histoquímica e quantificação da carga parasitária

Os cortes para processamento em imunohistoquímica foram desparafinados, hidratados 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 nos Laboratórios de Amebíase e Protozoários Intestinais / Depto Parasitologia e, de Protozooses / Depto Patologia Geral) e em seguida, incubados novamente 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 utilizados cortes histológicos obtidos de lesões ricas em *Giardia*. Como controle negativo, o anti-soro primário foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris concentrada por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em Entelan.

Após a reação imuno-histoquímica, 15 imagens aleatórias da porção proximal da mucosa do intestino delgado foram visualizadas através da objetiva de 10x e digitalizadas por meio da mesma microcâmara. Todos os pixels com tons de marrom dos trofozoítos (imunomarcados) foram selecionados para a criação de uma imagem binária, seguida de cálculo da área total de marcação. Processamento digital e recursos do software KS300 foram utilizados para eliminar artefatos (CALIARI, 1997).

4.10 Análise Estatística

Foram utilizados os testes de Grubbs para detecção de outliers, Kolmogorov-Smirnov para a verificação da normalidade da amostra, e para comparação entre os grupos experimentais. Os valores simétricos foram tratados estatisticamente pelos testes ANOVA seguido de teste de Tukey, e expressos em média \pm erro padrão. Os valores não-simétricos, por sua vez, foram tratados pelos testes de Kruskal Wallis seguido de Dunn e expressos em mediana com intervalo interquartil. Considerou-se o nível de significância de 5% para todas as análises ($p < 0,05$).

Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais foram identificadas nos gráficos por meio de asterisco (*) localizados acima da barra de representação de desvio-padrão. A ausência de marcação nestas regiões do gráfico indica inexistência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). As análises, testes, obtenção de valores de médias, medianas, desvio-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados, foram realizados no software Prism (GraphPad Software, San Diego California – USA), versão 6.0.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros gerais

A infecção pela cepa utilizada neste trabalho seguiu um padrão de infecção assintomática nos animais infectados (CTIn e IMIn), evidenciada pela ausência de alteração na consistência das fezes e outros sinais clínicos característicos da giardíase.

Observou-se nos animais imunossuprimidos uma perda acentuada de massa muscular, porém, o peso corporal dos animais dos grupos IM e IMIn, apesar de menor que dos outros grupos, não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). O tratamento imunossupressor ocasionou complicações no desenvolvimento físico dos gerbils, além de excessiva perda de pêlo. Notou-se ainda, um quadro de estresse significativo, evidenciado pelo comportamento irritadiço e agressivo dos animais dos grupos imunossuprimidos em comparação ao observado nos grupos CT e CTIn.

5.2 Imunossupressão

5.2.1 Leucograma

Os valores leucocitários dos animais do grupo IM obtidos por meio de leucogramas, evidenciaram valores da CTL estatisticamente mais baixa ($p < 0,05$) após o tratamento com o imunossupressor quando comparados a si próprios antes do tratamento, apresentando uma redução em cerca de 55% no número total de leucócitos circulantes. Ainda no grupo IM, verificou-se acentuada redução ($p < 0,05$) na porcentagem de leucócitos diferenciais circulantes: neutrófilos (58%), linfócitos (56%) e monócitos circulantes (26%) (**Tabela 1**).

No grupo CT, por sua vez, observam-se aumentos exponenciais ($p < 0,05$) na porcentagem de leucócitos totais circulantes ao final do experimento (94%), bem como de leucócitos diferenciais: neutrófilos (12%), linfócitos (103%) e monócitos (69%) (**Tabela 1**).

Comparando os valores leucocitários do grupo IM antes e após o tratamento imunossupressor, com os valores obtidos pelo grupo CT, comprova-se, portanto, a eficácia do efeito imunossupressor da DEX sobre os leucócitos circulantes de gerbils, após 25 dias de tratamento com o corticóide (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Contagens total e diferencial de leucócitos circulantes de gerbils, antes e após tratamento com dexametasona durante 25 dias.

GRUPOS	Contagem total de leucócitos		Contagem diferencial de leucócitos	
	Leucócitos (x) 10³/mm³	Neutrófilos (mm³)	Linfócitos (mm³)	Monócitos (mm³)
IM (I)	7971 ± 553,1	2465 ± 227,7	5133 ± 512,2	346,2 ± 62,74
IM (T)	4400 ± 464,5	1436 ± 183,8	2873 ± 317,0	91,21 ± 23,39
Valor de p	0,0003 *	0,0098 *	0,0021 *	0,0191 *
REDUÇÃO (%)	55,20	58,25	55,97	26,34
CT (I)	6233 ± 205,6	1801 ± 123,3	4420 ± 318,7	122,8 ± 36,71
CT (T)	12142 ± 1153	2346 ± 397,1	9588 ± 901,0	207,7 ± 52,34
Valor de p	0,0042 *	0,1856	0,0012 *	0,2991
AUMENTO (%)	94,80	12,30	103,48	69,13

Nota: IM (I) – Leucograma do grupo tratado com imunossupressor (antes do início do experimento). IM (T) – Leucograma do grupo tratado com imunossupressor (após o término do experimento). CT (I) – Leucograma do grupo não-tratado (antes do início do experimento). CT (T) – Leucograma do grupo não-tratado (após o término do experimento). Dados foram expressos como média dos valores dos leucogramas pré e pós-tratamento imunossupressor (média ± erro padrão; n=8). *p<0,05; one-way ANOVA e Tukey.

5.3 Análise da Permeabilidade Intestinal

Não foram observadas diferenças significativas na permeabilidade intestinal entre o grupo imunossuprimido-infectado: IMIn (0,1088 ± 0,005298) e os demais grupos experimentais: CT (0,1293 ± 0,03907), CTIn (0,05712 ± 0,008243) e IM (0,1259 ± 0,007370) (**Figura 8**).

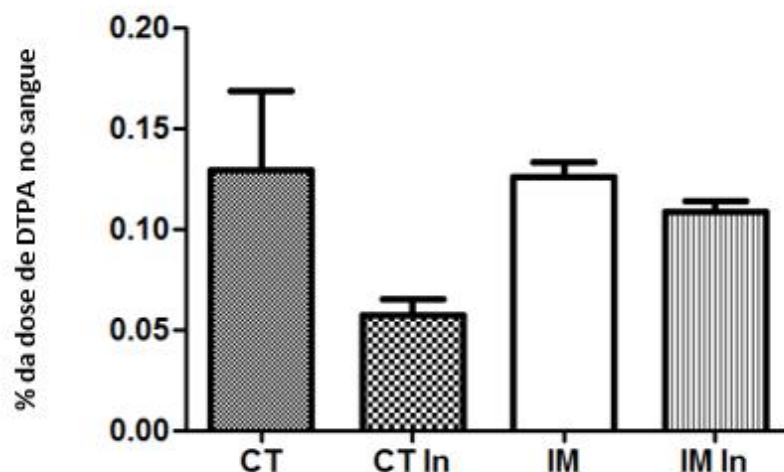


Figura 8 – Análise da permeabilidade duodenal de gerbils através da dose (%) de DTPA detectada no sangue dos animais, após 4h da gavagem da solução. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.

5.4 Análises histopatológicas

5.4.1 Histopatologia do baço

As regiões de polpa branca e polpa vermelha do grupo CT, se apresentaram em consonância com o baço em estado normal de ativação (**Figura 9a**). No grupo CTIn, por sua vez, a polpa branca se mostrou aumentada de tamanho, sugerindo intenso estado de ativação linfocitária clonal nos gerbils infectados não-imunossuprimidos (**Figura 9b**).

Os cortes histológicos do baço dos grupos IM e IMIn apresentaram tamanho reduzido quando comparados aos demais grupos, evidenciado pela menor dimensão dos cortes histológicos quando visualizados pela objetiva de 4x (**Figura 9c; d**). Tal redução mostrou-se mais proeminente no grupo IM (**Figura 9c**), quando comparada com o grupo IMIn (**Figura 9d**), evidenciando hipoplasia das áreas de polpa branca nos animais imunossuprimidos. Com relação aos animais infectados, a região de polpa branca se mostrou mais reduzida no grupo IMIn quando comparada ao grupo CTIn (**Figuras 9b,d**).

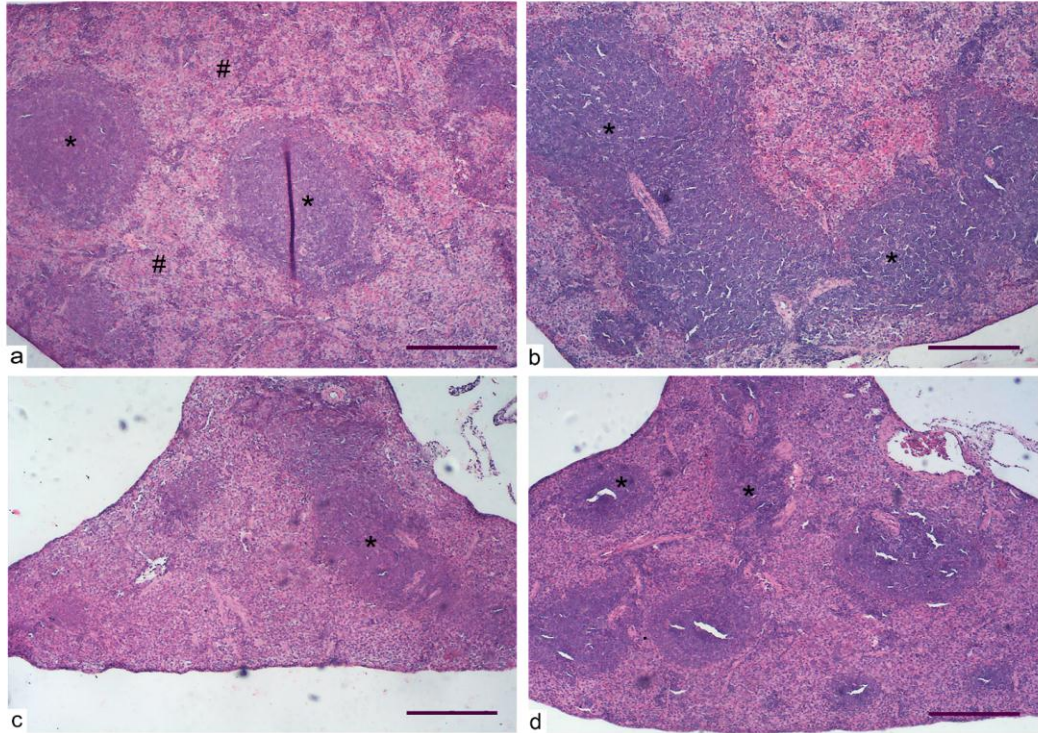


Figura 9 - Fotomicrografias do baço de gerbils. (a) grupo controle (CT): baço de aspecto histológico normal. Polpa branca (*) e polpa vermelha (#); (b) grupo controle-infectado por *G. lamblia* (CTIn): baço evidenciando hiperplasia da polpa branca (*); (c) grupo imunossuprimido não-infectado (IM): baço evidenciando região de polpa branca reduzida (*); (d) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn): região de polpa branca também reduzida (*). Hematoxilina & Eosina. Barra = 100µm.

5.4.2 Histopatologia do intestino delgado

O intestino delgado proximal (duodeno) no grupo CT se mostrou dentro dos padrões de normalidade, apresentando vilosidades altas, com celularidade normal na lâmina própria e a camada muscular da mucosa intacta. A submucosa se apresentou delgada, sem vasos hiperêmicos ou infiltrado inflamatório, assim como as camadas muscular e serosa que também não apresentaram alterações (**Figura 10a**).

Observou-se no grupo infectado CTIn, vilosidades mais curtas e mais espessas quando comparado aos grupos CT, IM e IMIn. A mucosa apresentou discreto edema nas vilosidades (**Figura 10b**) e infiltrado inflamatório moderado (**Figura 10b, c**). Detectou-se na submucosa leve infiltrado inflamatório mononuclear. Essas alterações envolveram mais de 50% do tecido presente na lâmina (considerando a análise em microscópio ótico através da objetiva de 10x). De forma pontual e bem esporádica, foram observadas erosões na mucosa. Não foram observadas ulcerações ou infiltrado de neutrófilos. A muscular da mucosa, assim como a camada muscular e serosa apresentaram-se sem alterações (**Figura 10b**).

As vilosidades intestinais no grupo IM se apresentaram mais longas e delgadas quando comparado ao grupo CT. Não foram observadas lesões nas camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. Destaca-se a reduzida celularidade da lâmina própria em todos os vilos no grupo IM (**Figura 10d**). Já o grupo IMIn, por sua vez, apresentou vilosidades mais longas quando comparado ao grupo CT, e celularidade na lâmina própria equivalente à do mesmo grupo, sendo assim, maior que a do grupo IM, mas menor que a do grupo CTIn. Observou-se ainda, no grupo IMIn, criptas hiperplásicas e edema moderado nas vilosidades (**Figura 10e**).

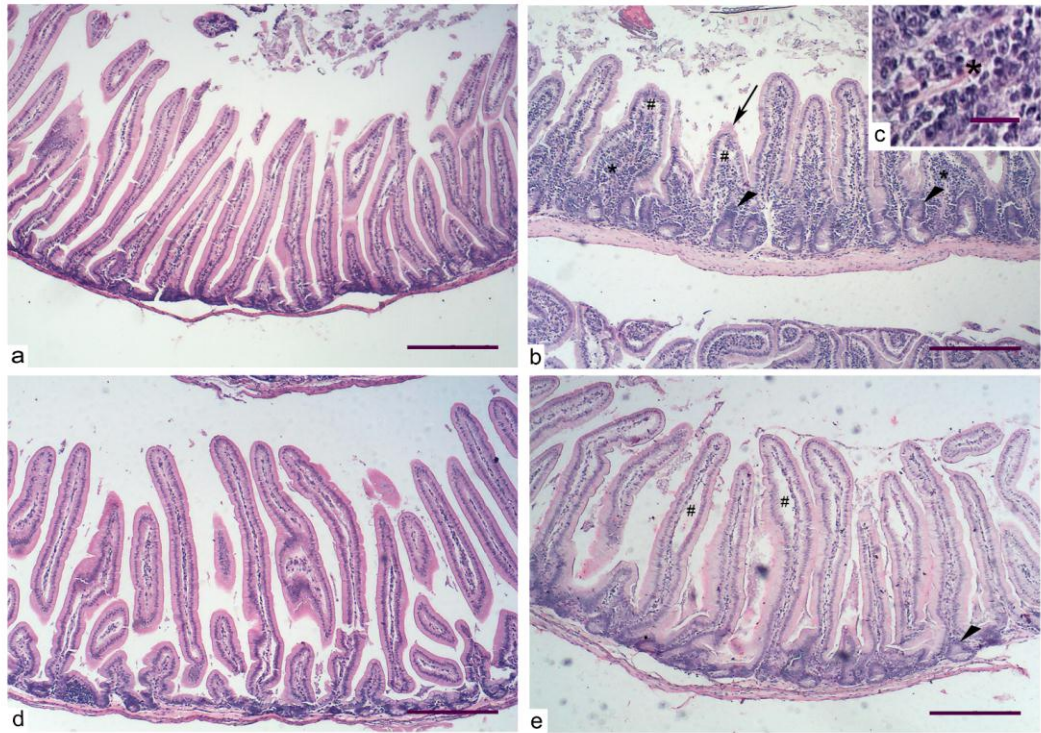


Figura 10 – Fotomicrografias do duodeno de gerbils. (a) grupo controle (CT): mucosa intestinal com arquitetura da mucosa preservada e ausência de inflamação; (b) grupo controle-infectado por *G. lamblia* (CTIn): edema discreto (#), infiltrado inflamatório moderado (*) criptas hiperplásicas (cabeças de seta), vilosidades achatadas (seta); (c) Detalhe da figura anterior mostrando infiltrado inflamatório na lâmina própria (*); (d) grupo imunossuprimido não-infectado (IM): mucosa duodenal de aspecto normal; (e) grupo imunossuprimido-infectado por *G. lamblia* (IMIn): presença de edema moderado (#) e hiperplasia das criptas (cabeça de seta). Hematoxilina & Eosina. (a, b, d, e): Barra = 100 µm; (c): Barra = 20 µm.

As alterações histopatológicas foram classificadas utilizando o sistema de escore (Figura 7). Observou-se escore 0 no grupo CT indicando mucosa intestinal dentro dos padrões de normalidade. O grupo CTIn apresentou escore 4, o que corresponde à mucosa apresentando erosões pontuais, infiltrado inflamatório moderado, diminuição no tamanho das vilosidades intestinais, hiperplasia das criptas em 25%, e infiltrado leve na submucosa. Já os grupos IM e IMIn apresentaram valores baixos de escore (0-1) em relação ao grupo CTIn, evidenciado pela presença de edema discreto na mucosa e/ou dilatação do vaso galactóforo e presença reduzida ou ausência de infiltrado inflamatório ($p < 0,05$) (Figura 11).

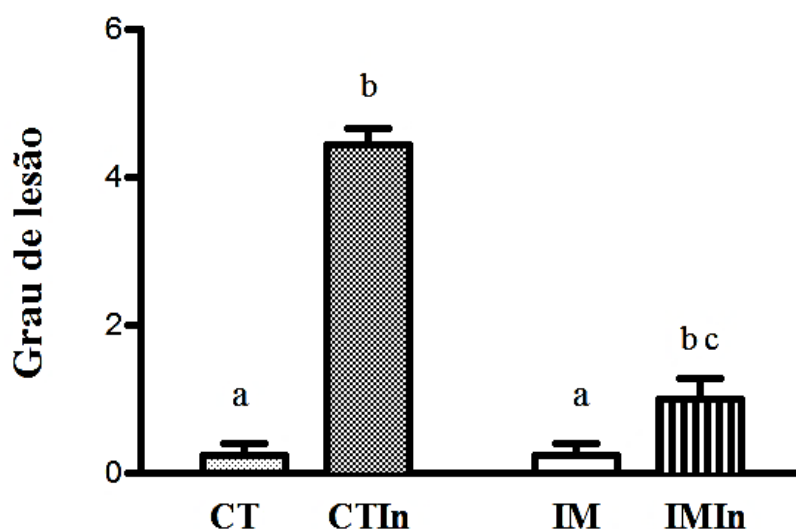


Figura 11 – Avaliação semi-quantitativa das lesões da mucosa duodenal de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes = $p < 0,05$; Barras pretas = infectados, Barras brancas = controles. One-way ANOVA e Tukey.

5.4.3 Altura das vilosidades intestinais

O grupo CTIn ($464,1 \mu\text{m} \pm 17,60 \mu\text{m}$) apresentou redução na altura das vilosidades intestinais quando comparado ao seu grupo controle, CT ($573,1 \mu\text{m} \pm 32,52 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$). Além disso, diferença estatística entre o grupo CTIn e os grupos IM ($536,7 \mu\text{m} \pm 27,73 \mu\text{m}$) e IMIn ($508,8 \mu\text{m} \pm 29,64 \mu\text{m}$), assim como não houve entre os demais grupos entre si (Figura 10).

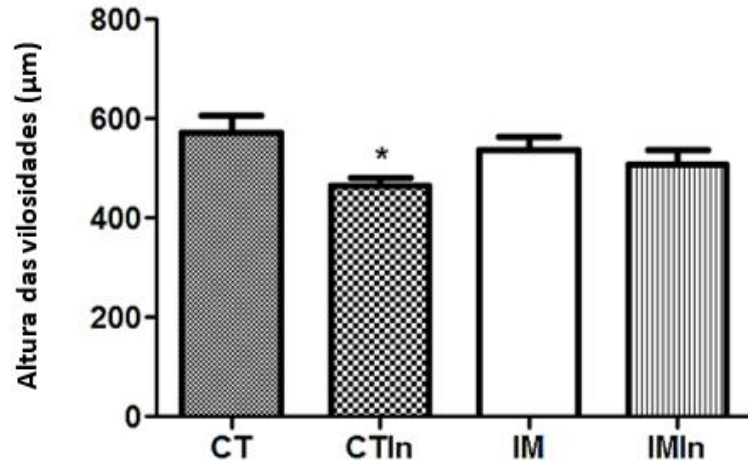


Figura 12 – Altura (µm) das vilosidades duodenais de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.

5.4.4 Profundidade das criptas intestinais

As criptas intestinais se apresentaram mais profundas (hiperplásicas) nos animais do grupo CTIn ($151,9 \mu\text{m} \pm 5,646 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$) com relação aos outros grupos CT ($69,09 \mu\text{m} \pm 1,965 \mu\text{m}$), IM ($62,14 \mu\text{m} \pm 2,005 \mu\text{m}$) e IMIn ($69,51 \mu\text{m} \pm 2,512 \mu\text{m}$). Não houveram diferenças estatísticas entre os demais grupos (**Figura 13**).

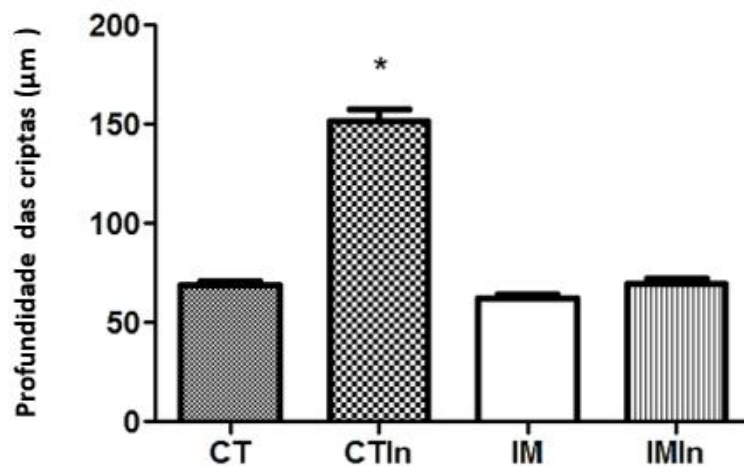


Figura 13 – Profundidade (µm) das criptas duodenais de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.

5.4.5 Relação Cripta/Vilosidade

A relação cripta/vilosidade do grupo CTIn ($0,3298 \pm 0,01657$) foi maior do que a dos grupos CT ($0,1231 \pm 0,007941$), IM ($0,1181 \pm 0,008320$) e IMIn ($0,1382 \pm 0,005521$) ($p < 0,05$), evidenciando intensa renovação epitelial no intestino dos animais infectados com *Giardia lamblia*, não-imunossuprimidos. Não houve diferença estatística entre os demais grupos (**Figura 14**).

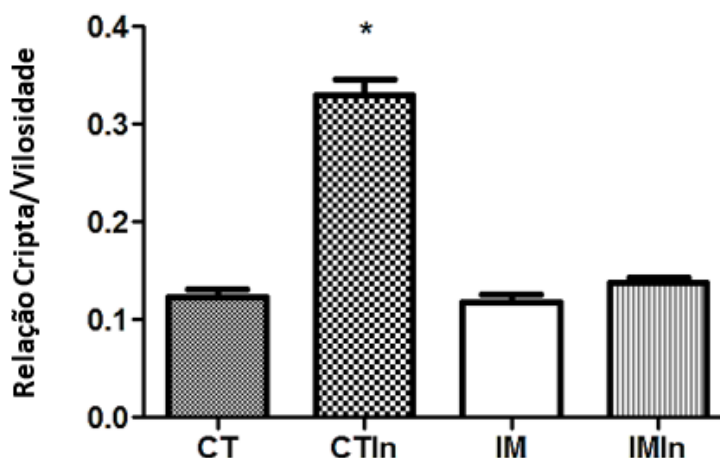


Figura 14 – Relação Cripta/Vilosidade duodenais de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. * $p < 0,05$; one-way ANOVA e Tukey.

5.5 Área de mucinas intestinais PAS positivas

As regiões PAS⁺ se mostraram menores, bem como o número e o tamanho das células caliciformes nos grupos CT e IM (**Figura 15a, c**). Observou-se um aumento na quantidade de células caliciformes, evidenciadas por amplas regiões PAS⁺ (relativas à marcação das mucinas intestinais) na superfície do epitélio e nas criptas intestinais nos grupos infectados (CTIn e IMIn) (**Figura 15b, d**). No entanto, observam-se células caliciformes de tamanho maior no grupo IMIn quando comparado ao grupo CTIn (**Figura 15b, d**).

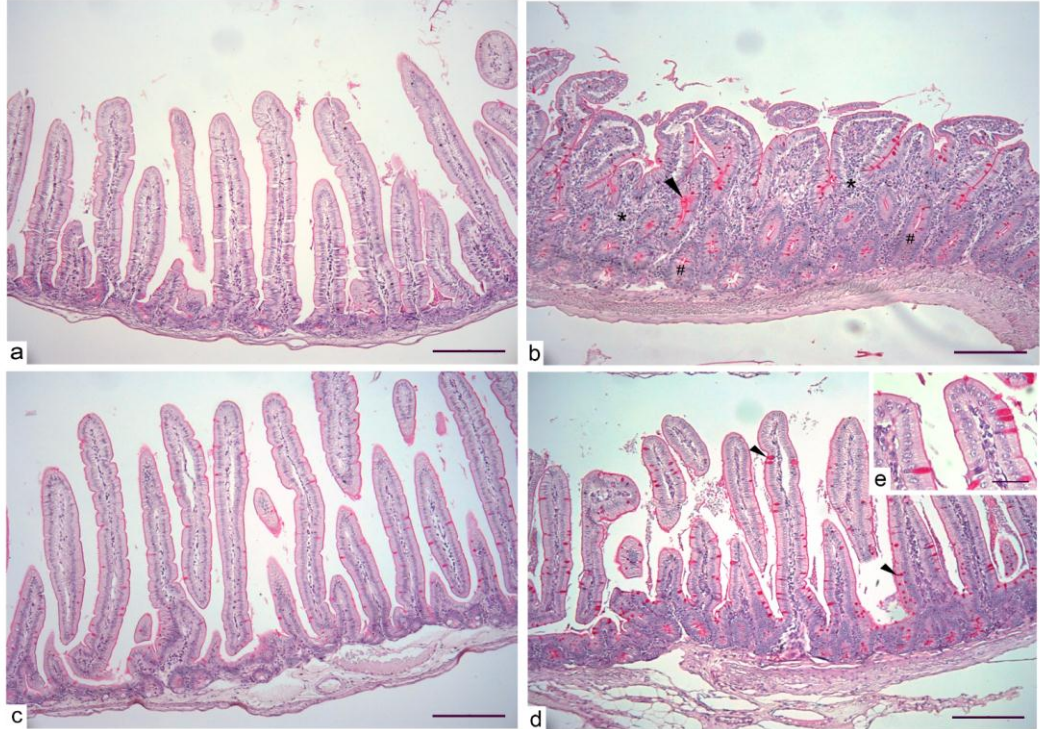


Figura 15 – Fotomicrografias de duodeno de gerbils evidenciando as áreas positivas para muco intestinal. (a) grupo controle (CT): mucosa intestinal com aspecto histológico normal mostrando regiões coradas por Ácido Periódico de Schiff (PAS); (b) grupo controle-infectado por *G. lamblia* (CTIn): mucosa intestinal evidenciando criptas hiperplásicas (#), infiltrado inflamatório moderado na lâmina própria (*) e discreto aumento de regiões PAS+ (cabeça de seta); (c) grupo imunossuprimido não-infectado (IM): regiões PAS+ apresentam um padrão semelhante ao da mucosa intestinal normal; (d) grupo imunossuprimido-infectado por *G. lamblia* (IMIn): maiores regiões PAS+ e hiperplasia de células caliciformes (cabeças de setas); (e) maior aumento da figura anterior evidenciando as células caliciformes. Ácido Periódico de Schiff. (a,b,c,d): Barra = 100µm; (e): Barra = 20 µm.

Identificou-se um aumento estatisticamente significativo na produção de muco pelo grupo IMIn [43694 μm^2 (36751 μm^2 - 74759 μm^2)] evidenciado por maior área PAS positiva marcada na mucosa intestinal dos animais imunossuprimidos-infectados, quando comparado aos demais grupos: CT [28465 μm^2 (17359 μm^2 - 38008 μm^2)], CTIn [30342 μm^2 (22607 μm^2 - 35285 μm^2)] e IM [24659 μm^2 (18395 μm^2 - 28898 μm^2)]. Não houve diferença estatística entre os grupos CT, CTIn e IM (**Figura 16**).

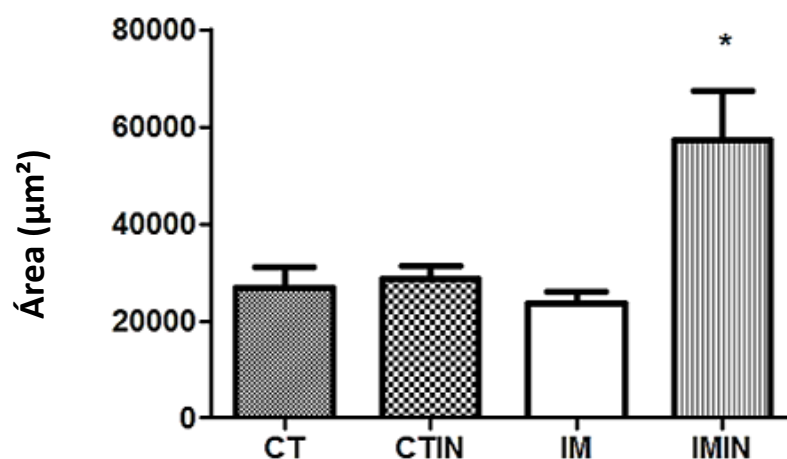


Figura 16 – Área (μm^2) de marcação PAS positiva na mucosa duodenal de gerbils. (CT) grupo controle; (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IM) grupo imunossuprimido não-infectado; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como mediana e intervalos interquartis. * $p < 0,05$; Kruskal Wallis e Dunn.

5.6 Análise da área de trofozoítos de *Giardia lamblia* imunomarcados

Realizou-se a mensuração dos trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal e também daqueles presentes no lúmen do duodeno, identificados por meio de reação imuno-histoquímica (**Figura 17**). Observou-se um maior número de trofozoítos imunomarcados livres no lúmen e/ou aderidos à mucosa, no grupo IMIn (**Figura 17a**) quando comparado ao grupo CTIn (**Figura 17b**).

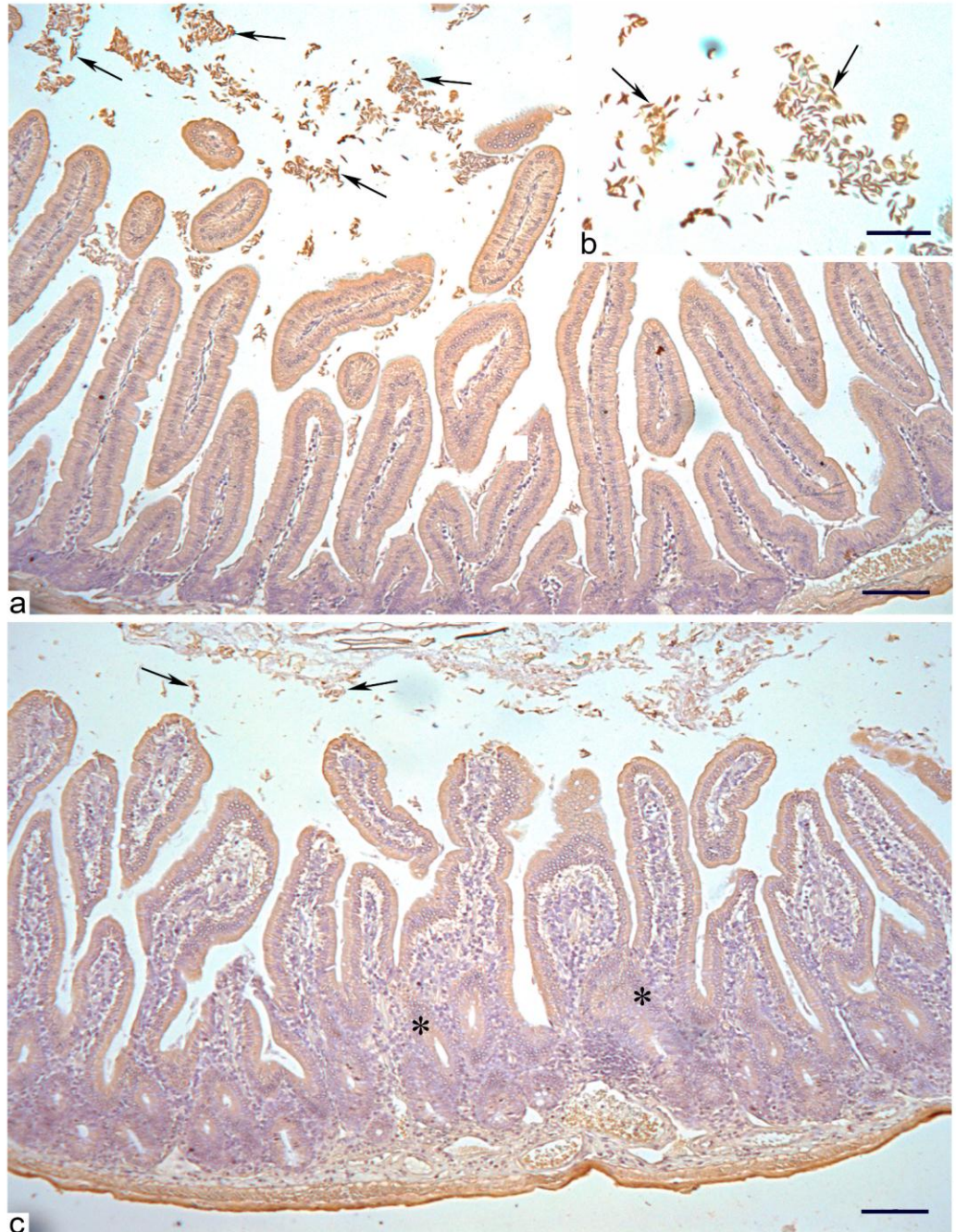


Figura 17 – Fotomicrografias de reação imuno-histoquímica para trofozoítos de *Giardia lamblia*. (a) Grupo imunossuprimido-infectado por *G. lamblia* (IMIn): presença de grande número de trofozoítos de *G. lamblia* imunomarcados no lúmen intestinal (setas); (b) Maior aumento da figura anterior mostrando trofozoítos imunomarcados (setas); (c) Grupo controle-infectado por *G. lamblia* (CTIn): presença de trofozoítos de *G. lamblia* imunomarcados no lúmen intestinal. Hiperplasia de criptas (*). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. (a,c): Barra = 100 µm; (b) Barra = 10 µm.

A análise quantitativa confirmou maior área de trofozoítos imunomarcados ($p < 0,05$) nos animais do grupo IMIn ($1168 \pm 68,27$) quando comparado ao grupo CTIn ($2040 \pm 140,3$), evidenciando um maior parasitismo no grupo imunossuprimido (**Figura 18**).

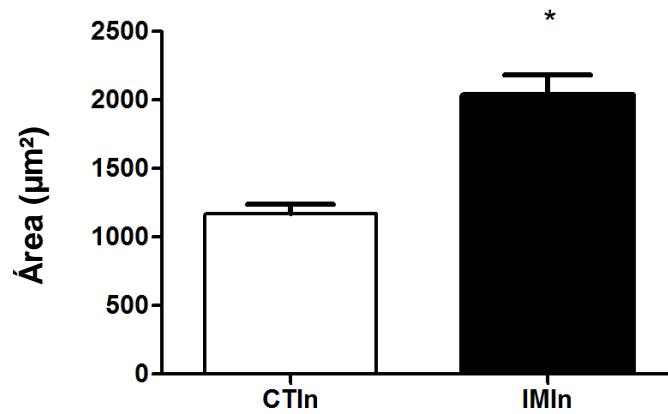


Figura 18 – Área de marcação imuno-histoquímica positiva para trofozoítos de *G. lamblia* na mucosa duodenal de gerbils infectados. (CTIn) grupo controle-infectado por *G. lamblia*; (IMIn) grupo imunossuprimido infectado por *G. lamblia* (IMIn). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; test T student

Discussão

6. DISCUSSÃO

As doenças diarreicas são responsáveis por relevantes problemas no cenário de saúde pública mundial, representando a maior causa de morbidade e morte em crianças menores de 5 anos de idade, principalmente nos países em desenvolvimento. Nessas regiões os problemas tendem a ser acentuados, devido à sua íntima associação às negligências de ordem socio-econômicas e com o saneamento básico precário (MARIANO, 2014).

Nesse contexto, o protozoário *G. lamblia* (sin. *G. intestinalis*; *G. duodenalis*) assume significativa importância, por pertencer ao grupo de patógenos entéricos mais frequentemente identificado como agente causador de diarreia em todo o mundo (SAVIOLI *et al.*, 2006). Estima-se que existam cerca de 280 milhões de pessoas acometidas com diarreia aguda e outras manifestações clínicas em decorrência de infecções por *G. lamblia* anualmente, em regiões negligenciadas (ANKARKLEV *et al.*, 2010). Todavia, devido ao alto potencial zoonótico e disseminativo do parasito, *G. lamblia* também se apresenta como o protozoário mais comumente diagnosticado em surtos diarreicos que ocorrem nos países ricos, e em visitantes de áreas endêmicas (THOMPSON, 2000).

Dentre os grupos de maior vulnerabilidade nas infecções intestinais, os indivíduos imunodeprimidos/suprimidos são frequentemente reportados como pacientes que apresentam manifestações clínicas mais severas (SABBAGA, 1987; CURRENT & GARCIA, 1991; O'DONOGHUE, 1995; JABUR *et al.*, 1996). Estudos de casos clínicos relataram que indivíduos imunodeficientes infectados por protozoários entéricos, tais como *Cryptosporidium parvum*, apresentaram quadros de diarreia incontroláveis, desidratação diarreica aguda (20 ou mais evacuações por dia), e comprometimento dos ductos biliares e pancreáticos (CURRENT & GARCIA, 1991; O'DONOGHUE, 1995). Enquanto os indivíduos imunocompetentes infectados, por sua vez, evoluíram para a cura espontânea (JABUR *et al.*, 1996).

Pacientes mantidos por terapia imunossupressora durante longos períodos, em especial aqueles submetidos a transplantes de órgãos, frequentemente sofrem processos de reativação de infecções parasitárias diversas, tais como as causadas por *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium parvum* e *Strongyloides stercoralis*, que assumem um caráter infeccioso grave nesses indivíduos (HO & DUMMER, 1995). Em estudo relacionando infecções parasitárias em pacientes submetidos à transplante renal, observou-se casos extremos de estrogiloidíase sistêmica crônica após três meses do procedimento de

transplante, período no qual a imunossupressão aconteceu de forma mais acentuada (SABAGGA, 1987).

O processo infeccioso de *G. lamblia* em indivíduos imunocomprometidos foi timidamente reportado na literatura. Nos países desenvolvidos, as infecções por *G. lamblia* retratam as maiores prevalências de hospedeiros com a forma sintomática da doença (THOMPSON, 2000) e, também, acometidos por falhas diversas no sistema imune (BARSOUM, 2006). As desordens gastrointestinais oriundas da giardíase, se mostram mais frequentes a medida em que a incidência de pacientes imunodeficientes aumenta (EREN *et al.*, 2007) culminando em aumento na carga parasitária, cronicidade da infecção e danos, às vezes irreversíveis, à mucosa intestinal dessa população (AGARWAL & MAYER, 2013).

Dentre as centenas de imunodeficiências existentes, a hipogamaglobulinemia é uma síndrome caracterizada pela baixa produção de imunoglobulinas (Igs) que causa sérias deficiências na produção de células B e na funcionalidade das células T (JABUR *et al.*, 1996). Por esse motivo, pacientes hipogamaglobulinêmicos que apresentam níveis baixos de anticorpos IgA, IgM e IgG, frequentemente resultam em casos de giardíase sintomática crônica (LANGFORD *et al.*, 2002). A produção inadequada de anticorpos se apresenta, ainda, como a principal razão pela qual os indivíduos imunodeficientes apresentam quadros clínicos mais graves (ECKMANN, 2003).

Estudos demonstraram que a prevalência de cistos de *Giardia* recuperados em amostras de fezes de pacientes acometidos com hipogamaglobulinemia é significativamente maior quando comparados a indivíduos imunocompetentes (ANGARANO *et al.*, 1997; RUTTENBERG *et al.*, 1990; WEBSTER, 1980; FAUBERT, 2000). Relatos clínicos de crianças com hipogamaglobulinemia congênita ligada ao cromossomo X, e naquelas com hipogamaglobulinemia adquirida devido à Síndrome de Bruton, evidenciaram a ocorrência de quadros de diarreia em 100% dos pacientes infantis infectados por *G. lamblia* (AMENT & RUBIN, 1972; BOYD & BACHMAN, 1982; PERLMUTTER *et al.*, 1985).

A susceptibilidade dos indivíduos hipogamaglobulinêmicos às infecções por *G. lamblia* remota à importância de mecanismos mediados pela ação de anticorpos específicos e por células T, para eliminação de *G. lamblia* do lúmen intestinal dos infectados (HEYWORTH *et al.*, 1987; SERRADELL *et al.*, 2018). Além disso, as imunodeficiências podem prejudicar o tratamento da parasitose, tornando o paciente refratário ao tratamento com metronidazol (principal fármaco giardicida) (HEYWORTH *et al.*, 1987).

A maioria das cepas da espécie *G. lamblia* não infectam ratos adultos, nem mesmo aqueles que apresentam imunodeficiência severa (ECKMANN, 2003). Em associação, ratos infectados por *G. muris* nos primeiros dias de vida, geralmente eliminam o parasito precocemente, por volta dos dias 17-20 de idade, provavelmente relacionado a transferência de anticorpos maternos (HILL *et al.*, 1983). Tais evidências corroboram a existência de um eficiente, porém incompreensível mecanismo de defesa e de resistência apresentado pelo hospedeiro, frente às infecções por *Giardia*. Contudo, deve-se considerar também as características do parasito e do ambiente (incluindo o intestinal) para o estabelecimento da infecção (GIL, 2016).

Apesar desses relatos incisivos, há ainda na literatura, uma grande controvérsia envolvendo imunodeficiências e giardíase. Curso infeccioso brando, semelhante a pacientes imunocompetentes sintomáticos, foi relatado em pacientes hipogamaglobulinêmicos com severa deficiência na secreção de IgA e de outros anticorpos específicos anti-*Giardia* (ZINNEMAN & KAPLAN, 1972). Esses dados são corroborados por Teahon *et al.* (1994), que observaram ausência de severidade ou quadros persistentes de diarreia em pacientes infectados, concomitantemente, por HIV e *G. lamblia*, mesmo apresentando baixa contagem de células CD4⁺.

Em associação, Jones & Brown (1974) demonstraram a ausência de qualquer diferença nos níveis de IgA secretória e sérica específica anti-*Giardia*, entre pacientes hipogamaglobulinêmicos com giardíase e um grupo controle. Outras evidências reportaram ainda, que crianças acometidas por grave deficiência em células T devido à aplasia no timo, não apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *G. lamblia* quando comparadas a crianças imunocompetentes (WEBSTER, 1980).

Tais contradições clínicas observadas em pacientes imunocomprometidos acometidos por giardíase, demonstram que a resposta imune que protege o hospedeiro contra o desenvolvimento de danos a integridade da mucosa intestinal, parece não estar associada, exclusivamente, aos mecanismos clássicos mediados por anticorpos específicos, células CD4⁺ e outros subtipos de células T (SERRADELL *et al.*, 2018). Entretanto, diferentemente do que ocorre em várias outras infecções intestinais, a fisiopatologia na giardíase se apresenta como resultado de eventos multifatoriais pouco conhecidos, influenciados pela tríade epidemiológica (parasito, hospedeiro e ambiente) (GIL, 2016).

Atualmente, registra-se um aumento significativo de populações imunocomprometidas em todo o mundo, decorrentes do uso de drogas imunossupressoras

para o tratamento de deficiências imunes adquiridas ou congênitas (BARSOUM, 2006) ou por infecções pelo vírus HIV, sendo esta última cada vez mais incidente no contexto mundial (BARSOUM, 2006; STARK *et al.*, 2009). A escassez de dados na literatura correlacionando o uso de fármacos imunossupressores e pacientes com giardíase, aliado à controvérsia clínica observada em pacientes imunodeficientes infectados por *G. lamblia*, tornam o entendimento sobre a fisiopatologia da parasitose, nesse contexto, ainda mais obscuro (BACHUR *et al.*, 2008).

Contudo, sabe-se que as intervenções terapêuticas que alteram as respostas imunológicas dos indivíduos podem interferir drasticamente no equilíbrio entre os parasitos e seus hospedeiros, propiciando aumento na virulência de patógenos, incluindo microorganismos que geralmente não são considerados patogênicos, além de propiciar resistência ao tratamento em ambos os contextos patológicos (BARSOUM, 2006).

Os corticosteroides se apresentam como a classe de fármacos mais prescritos para o tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias, exibindo uma ação importante na resposta dos linfócitos T aos antígenos, suprimindo citocinas inflamatórias e, conseqüentemente, os danos ocasionados à mucosa intestinal pela resposta exacerbada aos antígenos próprios e/ou externos (MATI, 2009). Dentre os corticoides mais utilizados em terapias imunossupressoras, a dexametasona (DEX) é frequentemente o fármaco de escolha, por se mostrar altamente eficaz e ativo, com ações similares ao cortisol humano, apresentando cerca de 25 a 30 vezes maior potência do que a hidrocortisona, sem no entanto, desencadear efeitos adversos no metabolismo eletrolítico (MELO *et al.*, 1994; CZOCK *et al.*, 2005).

Os principais mecanismos da DEX são sobre os leucócitos, principalmente os linfócitos circulantes, sendo observado o fenômeno de apoptose acentuada dessas células após a administração do medicamento (MATTI, 2009). Além disso, o tratamento com DEX promove a inibição da acumulação e da migração de células inflamatórias, incluindo macrófagos e leucócitos para a região da inflamação (MELO *et al.*, 1994) inibe ainda, a ação fagocítica de células imunológicas, e de mediadores químicos da inflamação (CZOCK *et al.*, 2005).

Em infecções por *G. lamblia*, as células T, principalmente as CD4⁺, exercem um importante papel no controle e eliminação do parasito no intestino do hospedeiro infectado (SINGER & NASH, 2000), o que sugere que a terapia imunossupressora com a DEX possa se apresentar como um fator contribuinte para a cronicidade e severidade da parasitose.

Considerando essa hipótese, buscou-se por meio deste trabalho, contribuir para o esclarecimento do assunto, avaliando a integridade do intestino delgado de gerbils imunossuprimidos através de terapia com dexametasona, e desafiados experimentalmente com *G. lamblia*. Para tal, foram realizadas avaliações histopatológicas e morfométricas no intestino delgado dos animais, tais como: i) a altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais, respectivamente; ii) a quantificação da produção de muco intestinal e o parasitismo, além de avaliação da integridade do epitélio intestinal por meio da medição da permeabilidade no duodeno dos roedores.

Estudos prévios sobre a fisiopatologia da giardíase em gerbils, demonstraram que a infecção por *G. lamblia* pode ocasionar profundas mudanças na arquitetura da mucosa intestinal desses animais, semelhante ao encontrado em seres humanos. Dentre as lesões ocorrentes, incluem-se o achatamento e/ou atrofia de vilosidades intestinais, aumento do infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa, hiperplasia de criptas intestinais e das células caliciformes, que resultam em aumento na secreção de muco na superfície do epitélio (FERGUSON *et al.*, 1990; BURET *et al.*, 1992; SCOTT *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2008; COTTON *et al.*, 2011; 2014; FONSECA, 2015; VENTURA, 2016).

No presente estudo, observamos que o inóculo utilizado para o desafio dos gerbils do grupo CTIn, promoveu uma infecção cujo padrão se mostrou semelhante ao relatado na literatura (FERGUSON *et al.*, 1990; SCOTT *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2008; COTTON *et al.*, 2011; 2014). Evidenciou-se diminuição na altura das vilosidades, que também se apresentaram mais espessas (presença de edema leve) quando comparadas aos demais grupos. As criptas sofreram hiperplasia acentuada, houve um aumento na relação cripta/vilosidade e, registrou-se, ainda, a ocorrência de infiltrado inflamatório principalmente mononuclear na lâmina própria e na submucosa.

Na mucosa intestinal saudável, a renovação das células epiteliais ocorre a cada 3-5 dias, iniciando-se pelas células da cripta que se movem lentamente formando novas vilosidades (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015). Em processos de dano epitelial infeccioso, observa-se um aumento na taxa de renovação epitelial, observado pela elevação da razão cripta/vilosidade, como uma tentativa de reparação tecidual (FONSECA, 2015). Em infecções por *Giardia lamblia* o aumento na relação cripta/vilosidade é um dos fatores mais recorrentes, sugerindo que as lesões epiteliais causadas pelo parasito sirvam como um estímulo para o desenvolvimento das células das criptas e regeneração dos vilos (SCOTT *et al.*, 2004), corroborando os achados neste estudo.

Entretanto, ao analisarmos os parâmetros histopatológicos do intestino dos animais do grupo IMIn, observamos criptas maiores e células caliciformes hiperplásicas. As vilosidades se apresentaram mais longas e íntegras, e a celularidade na lâmina própria reduzida. Ao comparar esses resultados com os achados no grupo CTIn, observa-se que o inóculo utilizado se mostrou hábil em produzir alterações que culminaram em redução na altura das vilosidades dos animais imunocompetentes, mas não nos imunossuprimidos. Infere-se que, nessa circunstância, fatores relacionados ao hospedeiro estejam implicados na patogênese da infecção, em especial, na indução de resposta imune inflamatória exacerbada.

Em algumas doenças infecciosas, os principais aspectos fisiopatológicos não se relacionam a uma ação direta do patógeno, mas sim, como uma resposta imune anormal do hospedeiro, resultando em dano tecidual (COOKE *et al.*, 2004). Estudos prévios utilizando camundongos timo-depletados infectados com *Giardia*, demonstraram que as lesões intestinais, incluindo atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas eram resultantes de resposta imune mediada por células T ativadas, que foram reconstituídas nesse modelo (da CUNHA *et al.*, 1990; SCOTT *et al.*, 2004).

Durante o curso da infecção por *G. lamblia*, observa-se a ocorrência de uma transição gradual de linfócitos citotóxicos e células T auxiliares para os compartimentos intra-epitelial e lâmina própria, promovendo uma reação imune local mediada por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (GOTTSTEIN *et al.*, 1991; VINAYAK *et al.*, 1991; VENKATESAN *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 2004). Evidências de que as células CD4⁺ estão envolvidas na eliminação de *G. lamblia* no lúmen intestinal já foram demonstradas (SCOTT *et al.*, 2004), sendo a depleção desse tipo celular fator resultante em giardiase crônica (HEYWORTH *et al.*, 1987; SINGER & NASH, 2000). Por outro lado, a depleção de células CD8⁺ e outros subtipos de células T citotóxicas parecem não ter relação com a resolução da infecção, mas sim, podem estar envolvidas no surgimento de danos da superfície da borda em escova formada pelas microvilosidades intestinais (MULLER *et al.*, 1998; NUSSLER *et al.*, 2000; HONMA *et al.*, 2001; SCOTT *et al.*, 2004).

As microvilosidade são estruturas intestinais importantes no processo de absorção de nutrientes e também abrigam as enzimas dissacaridases. A destruição da borda em escova, resulta em perda de área de superfície absorptiva no intestino, culminando em má-absorção e digestão de nutrientes decorrentes da giardiase (COTTON *et al.*, 2011). O acúmulo de eletrólitos secretados, não-absorvidos e não-digeridos, e de macromoléculas, favorecem a formação de um ambiente osmótico que capta líquido para o lúmen intestinal durante a

infecção, e aparenta estar envolvido no aumento do trânsito intestinal, e nos quadros de distensão abdominal, diarreia e esteatorreia (GIL, 2016).

Os nossos achados corroboram as inferências de Scott *et al.*, (2004) de que as principais lesões na mucosa intestinal, observadas nas infecções por *G. lamblia*, estão relacionadas principalmente, com uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro na tentativa de eliminação do patógeno. Esse fator se mostra dependente de mecanismos mediados por células T, uma vez que somente os animais imunocompetentes infectados apresentaram lesões e presença de infiltrado inflamatório no sítio da infecção. Similarmente, a ocorrência de atrofia de vilosidades intestinais demonstrou ser dependente da ação de linfócitos T em várias outras desordens, tais como na doença-do-enxerto verso hospedeiro, anafilaxia intestinal e na triquinose (FERGUSON, 1976; MANSON-SMITH *et al.*, 1979; FERREIRA *et al.*, 1990; LIONETTI *et al.*, 1993).

O tratamento com a DEX é capaz de inibir a síntese ou liberação de interleucina 1 (IL)-1, interferon (IFN) γ , TNF- α , quimiocinas, enzimas correlatadas ao processo inflamatório de reduzir a expressão de moléculas de adesão (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 1996; FALKENSTEIN *et al.*, 2000; SCHLEIMER, 2004; CZOCK *et al.*, 2005). Em várias infecções entéricas o sistema imune em perfeito estado de ativação é imprescindível para a eliminação dos patógenos, no entanto, na giardíase, tal mecanismo não apresenta significativa importância (ECKMANN, 2003). Aparentemente, a supressão de muitos mecanismos ligados à resposta inflamatória, devido à terapia corticoide, pode ter atuado como um fator protetor da integridade intestinal, conforme evidenciado no grupo IMIn.

Avaliamos a integridade do epitélio intestinal através da dosagem da concentração de ^{99m}Tc -EDTA no sangue dos gerbils, no entanto, não evidenciamos alterações na permeabilidade intestinal em nenhum dos grupos experimentais. Esse achado corrobora com a ausência de lesões significativas, e com a inferência de que o sistema imune inato atuou como um mecanismo fundamental para a proteção da integridade da mucosa no grupo IMIn.

Os achados sobre permeabilidade intestinal do nosso trabalho, diferem daqueles encontrados por (SCOTT *et al.*, 2002) que demonstraram aumento da permeabilidade do intestino delgado em camundongos com depleção do timo e deficientes na maturação de células imunes, e infectados por *G. lamblia*. No trabalho citado, evidenciou-se que as alterações na permeabilidade intestinal dos animais se correlacionava com o pico de colonização da mucosa pelos trofozoítos, ocorrendo não somente nos animais atímicos, mas também no grupo controle. Desse modo, conclui-se que os fatores que culminaram em

aumento na permeabilidade dos animais atímicos, bem como na ausência de alterações na permeabilidade intestinal dos nossos animais imunossuprimidos, parecem ser independentes de mecanismos mediados por células T (SINGER & NASH, 2000).

Nossos resultados também foram obtidos no pico da infecção, quatorze dias (GIL *et al.*, 2016). Contudo, devemos considerar diferenças inerentes à cepa utilizada e também a substância usada para medir a permeabilidade. O DTPA é uma molécula grande (393,35 g/mol), que ao ser detectada no sangue confere significância a lesão intestinal e infere rompimento da barreira epitelial (ANDRADE *et al.*, 2015). Desse modo, avaliando nossos resultados, podemos observar que os animais do grupo CTIn apresentaram menor alteração na permeabilidade intestinal, apesar de não ter sido significativa. Talvez o hospedeiro tenha respondido a infecção, induzindo uma resposta imune reparadora da barreira intestinal. Contudo, devemos ainda considerar que a integridade da mucosa pode relacionar-se ao tipo de hospedeiro, a cepa avaliada, a carga parasitária e ao período da infecção.

De acordo com os achados de Scott *et al.*, (2002) outro aspecto deve ser avaliado, no que diz respeito a permeabilidade intestinal. A demonstração prévia de que o aumento na permeabilidade ocasionado por *G. lamblia* em hospedeiro atímico e no grupo controle se apresentou concomitante com o aumento das taxas de fosforilação da miosina quinase de cadeia leve (MLC) e conseqüente reorganização das proteínas F-actina e ZO-1, sugere que que esse evento além de ser independente de respostas inflamatórias, é oriundo, exclusivamente da variação genética do parasito. Contudo, diferentes testes de permeabilidade e estudos bioquímicos necessitam ser feitos para melhor elucidar esse fenômeno em modelo imunossuprimido.

Utilizamos a coloração PAS para identificar e quantificar a área de produção de muco no intestino delgado. Evidenciamos, um aumento acentuado na produção de mucinas, demonstrado por maiores áreas PAS⁺ no grupo imunossuprimido-infectado (IMIn) comparado aos demais grupos. Contudo, observamos que a quantificação do muco produzido pelos animais do grupo IMIn, quando comparada ao grupo CTIn, foi significativamente maior, o que pode ter contribuído para a ausência de lesões intestinais nos animais imunossuprimidos.

As mucinas que compõem a camada de muco intestinal são secretadas pelas células caliciformes, e atuam como um mecanismo da resposta imunológica inata do hospedeiro, protegendo o epitélio da ação de enzimas digestivas, bem como dificultando a adesão de patógenos luminiais aos enterócitos, incluindo *Giardia* (ECKMANN, 2003; MULLER & von

ALLMEN, 2005; ROXSTROM-LINDQUIST *et al.*, 2006; LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015). Na giardíase crônica, a perda de função da barreira intestinal pode ser ocasionada, dentre vários outros fatores, pela secreção reduzida de muco, favorecendo a colonização do intestino pelos trofozoítos (O'HARA & BURET, 2008; HALLIEZ & BURET, 2013).

Por meio do presente estudo não foi possível estabelecer uma relação clara entre a imunossupressão e o aumento na produção de muco intestinal pelos animais infectados. No entanto, nossos resultados demonstram que a maior quantidade de muco intestinal produzido pelo grupo IMIn, pode representar um mecanismo protetivo da mucosa, estimulado pela *Giardia*, durante a infecção aguda, período no qual ainda não há estabelecimento de resposta imune específica (MULLER & von ALLMEN, 2005). Provavelmente, como resposta alternativa, a mucosa teria aumentado a produção de muco para compensar a redução da defesa mediada pelas células da lâmina própria, muito reduzidas nesse grupo.

A ausência de lesões no grupo IMIn reforça que a resposta imune é a principal responsável pelo surgimento de lesões na giardíase, além de controlar a infecção e lograr algum nível de proteção.

Observa-se em quase todos os tipos de infecções, uma menor prevalência de indivíduos que manifestam a doença quando comparada ao número total de expostos ao agente infeccioso. Tal indicativo infere, que na maioria dos casos, os hospedeiros conseguem limitar o progresso da infecção (JANEWAY, 2001). Em mais de 85% dos casos, as infecções por *Giardia lamblia* possuem curso autolimitado, o que indica a existência de um eficiente mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasito (FAUBERT, 2000).

O aumento do parasitismo evidenciado no grupo IMIn quando comparado ao grupo CTIn, corrobora os achados de (NAIR *et al.*, 1981) de que indivíduos que fazem uso de terapia imunossupressora, acometidos com giardíase, possuem dificuldades em eliminar o parasito do intestino, e podem ainda, apresentar aumento no número de parasitos no lúmen intestinal. No entanto, as razões que tornam um indivíduo susceptível ou resistente à infecção por *G. lamblia* se apresentam multifatoriais (SINGER & NASH, 2000).

Os protozoários parasitos possuem mecanismos de escape contra as agressões mediadas pelo sistema imune, o que os permite permanecer no hospedeiro por longos períodos, causando infecções assintomáticas crônicas, ainda que não cause a doença (JANEWAY, 2001; GIL, 2016). Nossos resultados corroboram com as observações dos colegas supracitados. Observou-se no grupo IMIn, um significativo aumento na quantidade

de trofozoítos encontrados no lúmen dos animais quando comparados ao grupo CTIn. Em animais imunossuprimidos infere-se que a redução das respostas imunológicas seja um fator essencial para o aumento do parasitismo, e conseqüente aumento da intensidade das lesões, devido à redução de células efectoras e produção limitada de citocinas importantes para a eliminação do agente patogênico (ECKMANN, 2003; AGARWAL & MAYER, 2013).

Contudo, em nosso modelo não foi observado aumento das lesões, muito pelo contrário, a mucosa se apresentou sem alterações importantes, à exceção de maior produção de muco e células caliciformes. Estes resultados vêm reforçar o benefício da resposta inata na infecção nos imunossuprimidos.

O aumento na produção de muco intestinal apresentado pelo grupo IMIn suscita seu envolvimento de forma sinérgica, tanto no controle da adesão dos trofozoítos de *G. lamblia* no epitélio, como também na proteção do parasito contra a ação de enzimas digestivas, sais biliares e mudanças no pH intestinal do hospedeiro (FONSECA, 2015).

Fonseca (2015) relata que alguns tipos de mucinas se mostram hábeis em criar um micro-ambiente entre o lúmen e o epitélio que favorece a sobrevivência de trofozoítos de *G. lamblia* e até mesmo otimiza a sua adesão. Nossos resultados inferem que o aumento concomitante na produção de muco e na carga parasitária no grupo IMIn aparenta corroborar com essa afirmativa – ainda que haja a necessidade de realização de outras experimentações comprobatórias – sugerindo, ainda, que o parasito possa ter se mantido preso a densa camada de mucina, protegido do ataque do sistema imune do hospedeiro, ainda que suprimido nesse grupo, e outras adversidades, sem no entanto, obter acesso livre aos enterócitos e sem causar-lhes alterações.

Os resultados deste trabalho sugerem que na ausência de uma resposta imunológica específica anti-*Giardia*, o sistema imune inato apresente uma alta eficiência em limitar o estabelecimento de infecções pelo parasito, impedindo a aderência dos trofozoítos ao epitélio intestinal do hospedeiro, principal gatilho iniciador das manifestações fisiopatológicas, e conseqüentemente, clínicas na giardíase. No entanto, a resposta imune adaptativa se mostra importante na resolutividade da infecção aguda, conforme evidenciado pelo menor número de trofozoítos encontrados no lúmen intestinal do grupo CTIn comparado ao grupo IMIn.

A principal ação do sistema imune inato em nosso modelo imunossuprimido e infectado por *G. lamblia*, configurou-se em promover aumento na produção de muco intestinal e proteção à integridade do epitélio, resultando em ausência de lesões e na

manutenção da integridade da mucosa intestinal dos animais. Todavia, novos estudos avaliando a infecção em modelo imunossuprimido, por um maior período de tempo, talvez possam contribuir com maiores elucidações sobre a ocorrência ou não de manifestações clínicas decorrentes de infecções crônicas em imunossuprimidos, e sobre o padrão da resposta imunológica do hospedeiro contra *G. lamblia*, nesse contexto.

Evidenciamos ainda que, embora a resposta imunológica específica anti-*Giardia* se manifeste como um fator importante para a produção de lesões na giardiase, em nosso modelo, a redução do número de leucócitos circulantes e da migração de leucócitos para o sítio da infecção no grupo IMIn, resultou em uma ação protetiva da integridade duodenal dos animais. Esses resultados podem ajudar a elucidar as razões pelas quais muitos indivíduos imunodeficientes permanecem assintomáticos, embora carreadores e disseminadores de *G. lamblia* durante longos períodos.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- A redução dos danos intestinais nos animais imunossuprimidos, confirma o protagonismo da resposta imune na enterite produzida por *G. lamblia*;
- O muco constituiu importante fator de proteção nos animais imunossuprimidos, atuando como um dificultador da adesão dos parasitos à mucosa intestinal;
- O aumento na produção de muco intestinal aparenta ser um evento correlacionado ao aumento na carga parasitária dos animais imunossuprimidos, sendo a atuação do muco de forma sinérgica na manutenção da integridade da mucosa e, também na proteção dos trofozoítos no micro-ambiente intestinal;
- O aumento do número de parasitos no lúmen intestinal de gerbils imunossuprimidos infectados, confirma a cronicidade da giardíase em humanos imunossuprimidos, suscitando os gerbils como bons modelos para o estudo de infecções por *Giardia lamblia* nesses hospedeiros, ainda que assintomáticos.

Referências

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, L. and Rivolta, M.N. (2015) Aminoglycoside ototoxicity and hair cell ablation in the adult gerbil: a simple model to study hair cell loss and regeneration. *Hearing Research* **325**, 12-26.
- Adams. P.J., Monis, P.T., Elliot, A.D., Thompson, R.C.A. (2004) Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and ef1 alpha identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia. *Infect Genet Evol* **4**(4), 365-70.
- Adam, R.D. (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Reviews* **55**(4), 706–732.
- Adam, R.D. (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* **14**, 447–475.
- Agarwal, S. and Mayer L. (2013) Diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in patients with primary immunodeficiency. *Clin Gastroen Hepatolog* **11**, 1050–1063.
- Allain, T., Amat, C.B., Motta, J.P., Manko, A., and Buret, A.G. (2017) Interactions of *Giardia* sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers* **5**(1), e1274354.
- Alia, S.A. and Hilla, D.R. (2003) *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* **16**,453–460.
- Amorim, R.M.R. (2008) Cinética da eliminação de cistos e resposta imune humoral sistêmica e secretora intestinal em gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente com *Giardia duodenalis*. Uberlândia: MG. 96 P. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Univ. Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Andersen, Y.S. *et al.* (2006) Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun* **74**, 2473–2476.
- Andrade, M.E.R., Santos, R.D.G.C.D., Soares, A.D.N., Costa, K.A., Fernandes, S.O.A., de Souza, C.M., Cassali, G.D., de Souza, A.L., Faria, A.M.C. and Cardoso, V.N. (2015) Pretreatment and treatment with L-arginine attenuate weight loss and bacterial translocation in dextran sulfate sodium colitis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **2015**, 8.

- Andrews, R.H., Adams, M., Boreham, P.F.L., Mayrhofer, G. and Meloni, B.P. (1989) *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol* **19**, 183–190.
- Angarano, G., Maggi, P., Di Bari, M.A., Larocca, A.M.V., Congedo, P., DeBari, C., Brandonisio, O. and Chiodo, F. (1997) Giardiasis in HIV: a possible role in patients with severe immune deficiency. *Eur J Epidemiol.* **13**, 485– 487.
- Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K. and Svärd, S.G. (2010) Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiology* **8**, 413-422.
- Araujo, N.S., Mundim, M.J.S., Gomes, M.A., Amorim, M.R.R., Viana, J.C., Queiroz R.P., Rossi, M.A., Cury, M.C. (2008) *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. *Exp Parasitol* **118**, 449-57.
- Awad, W.A., Hess, C. and Hess, M. (2017) Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens. *Toxins* **9**(2), 60.
- Bakırcı, S., Bilgiç, H.B., Köse, O., Aksulu, A., Hacılarlıoğlu, S., Karagenç, T., Çavuş, İ. and Özbilgin, A. (2015) Gerbils, As Experimental Animals (*Meriones unguiculatus*): Is A Good Role Model for *Leishmania major*? *Turkish Journal of Parasitology* **39**(3), 212-7.
- Bachur, T.P., Vale, J.M., Coelho, I.C., Queiroz, T.R. and Chaves, C.D.S. (2008) Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis.* **12**, 115–122.
- Bjarnason, I., Macpherson, A. and Hollander, D. (1995) Intestinal permeability: An overview. *Gastroenterology* **108** (5), 1566–1581, 1995.
- Baldursson, S. and Karansis, P. (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res* **45**(20), 6603-6614.
- Bansal D., Ahatti, H.S., Sehgal, R. (2005) Altered lipid parameters in patients infected with *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Giardia lamblia*. *Br J Biomed Sci* **62** (2), 63-65.

- Barber, A.E., Jones, W.G., Minei, J.P., Fahey, T., Lowry, S.F. and Shires, T. (1991) Bacterial overgrowth and intestinal atrophy in the etiology of gut barrier failure in the rat. *The American Journal of Surgery* **161**, 300-304.
- Bayraktar, M.R. Nihayet, M. and Rıza, D. (2005) Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop.* 95, 116–122.
- Barsoum, R. S. (2006) Parasitic infections in transplant recipients. *Nat Clin Pract Nephrol.* **2**, 490–503.
- Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M. and Slater, E.P. (1989) DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* **32**,737–748.
- Beato, M., Chavez, S. and Truss, M. (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* **61**,240–251.
- Behera, B., Mirdha, B.R., Makharia, G.K., Bhatnagar, S., Dattagupta, S. and Samantaray, J.C. (2008) Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. *Dig Dis Sci* **53**, 672–679.
- Berkman, D.S., Lescano, A.G., Gilman, R.H. and Lopez, S.L. (2003) Effects of stunting, diarrhoeal disease and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* **359**, 564-71.
- Berrilli, F., Di Cave, D., Cavallero, S. e D’Amelio, S. (2012) Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:141.
- Boyd, W.P.Jr. and Bachman, B.A. (1982) Gastrointestinal infections in the compromised host. *Med Clin N Am.* **66**, 743–753.
- Brandonisio, O., Maggi, P., Panaro, M.A., Lisi, S., Andriola, A., Acquafredda, A. and Angarano, G. (1999) Intestinal protozoa in HIV-infected patients in Apulia, South Italy. *Epidemiol Infect* **123**,457–462.
- Brink, A.K., Mahe, C., Watera, C., Lugada, E., Gilks, C., Whitworth, J. and French, N. (2002). Diarrhoea, CD4 counts and enteric infections in a community-based cohort of HIV-infected adults in Uganda. *J Infect* **45**,99– 106.

- Buret, A., Gall, D.G. and Olson, M.E. (1990) Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J Parasitol* **76**,403–409.
- Buret, A., Hardin, J.A., Olson, M.E. and Gall, D.G. (1992) Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*, **103**, 506-13.
- Buret, A.G., Scott, K.G.E. and Chin, A.C. (2002) Giardiasis: pathophysiology and pathogenesis *Giardia*, the cosmopolitan parasite. CAB International, In: Olson B, Olson ME, Wallis PM, eds, Wallingford, UK; 109–27.
- Buret, A.G. (2008) Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* **15**(15), 261-265.
- Busatti, H.G.N.O. (2006) Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol. Belo Horizonte: MG. 63p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Busatti, H.G.N.O., Santos, J.F.G. and Gomes, M.A. (2009) The old and new therapeutic approaches to the treatment of Giardiasis: Where are we? *Biologics: Targets and Therapy* **3**, 273-87.
- Busatti, H.G.N.O., Alves, R.J., Santana-Anjos, K.G., Gil, F.F., Cury, M.C., Vannier-Santos, M.A. and Gomes, M.A. (2013) Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization. *Diagn Microbiol Infect Dis* **75**(2), 160-4.
- Carranza, P.G. and Lujan, H.D. (2010) New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect* **12**, 71–80.
- Carter, E.A., Tompkins, R.G., Schiffrin, E., *et al.* (1990) Cutaneous thermal injury alters macromolecular permeability of rat small intestine. *Surgery* **10**(7), 335.
- Carvalho, M.D.J.S. (2011) Imunodeficiência comum variável: manifestações gastrintestinais a *Giardia lamblia*. Lisboa: Portugal. 157p. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Microbiologia clínica. Faculdade de Medicina de Lisboa. Universidade de Lisboa. Lisboa.

- Casellas, F., Aguade, S., Sariano, B., Accarino, A., Molero, J. and Guarner, L. (1986) IP to 99mTc-Diethylenetriaminopentaacetic acid in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* **81**, 767–770.
- Cavalier-Smith, T. (2003) Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European J Protist* **39**, 338–348.
- Caliari, M.V. (1997) *Principios Básicos de Morfometría Digital: KS300 para iniciantes*. Ed. UFMG.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention (2010). Giardiasis Surveillance - United States, 2006–2008. Surveillance Summaries, MMWR, 59(SS-6).
- Cedillo-Rivera, R., Leal, Y.A., Yopez-Mulia, L., Gómez-Delgado, A., Ortega-Pierres, G., Tapia-Conyer, R. and Muñoz, O. (2009) Seroepidemiology of Giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **80**, 6–10.
- Cevallos, A., Carnaby, S., James, M. and Farthing, J.G. (1995) Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterology* **109**, 766–773.
- Chen, N., Upcroft, J.A. and Upcroft, P. (1995) A *Giardia duodenalis* gene encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitol* **111**, 423–431.
- Chin, A.C., Teoh, D.A., Scott, K.G., Meddings, J.B., Macnaughton, W.K. and Buret, A.G. (2002) Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* **70**, 3673-3680.
- Ciancio, M.J., Vitiritti, L., Dhar, A., *et al.* (1992) Endotoxin-induced alterations in rat colonic water and electrolyte transport. *Gastroenterology* **10**(3),1431.
- Cimerman, S., Cimerman, B., Salomao, D. and Lewi, M.D. (1999) Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int J Infect Dis* **3**,203–206.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2000) How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline (CLSI document C28-A2). Wayne: CLSI, 59p.

- Cook, G.C. and Menzies, I.S. (1986) Intestinal absorption and unmediated permeation of sugars in post-infective tropical malabsorption (tropical sprue). *Digestion* **33** (2), 109–116.
- Cooke, A., Zaccane, P., Raine, T., Phillips, J.M. and Dunne, D.W. (2004) Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol* **20**, 316-21.
- Costa, K.A., Soares, A.D.N., Wanner, S.P., *et al.* (2014) L-arginine supplementation prevents increases in intestinal permeability and bacterial translocation in male Swiss mice subjected to physical exercise under environmental heat stress. *J Nutr* **144**, 218-223.
- Crossley, R., Marshall, J., Clark, J.T. and Holberton, D.V. (1986) Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to alpha-tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *J Cell Sci* **80**, 233-252.
- Cotte, L., Rabodonirina, M., Piens, M.A., Perreard, M., Mojon, M. and Trepo, C. (1993) Prevalence of intestinal protozoans in French patients infected with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**, 1024–1029.
- Cotton, J.A., Beatty, J.K. and Buret, A.G. (2011) Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology* **41**, 925-933.
- Cotton, J.A., Motta, J.P., Schenck, L.P., Hirota, S.A., Beck, P.L. and Buret, A.G. (2014) *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PLoS One* **9** (10), 109087.
- Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M. and H'ausler, U. (2005) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* **44** (1): 61-98.
- da Cunha, F.R., Forsyth, L.E., Richman, P.I., Wells, C., Spencer, J. and MacDonald, T.T. (1990) Changes in the rate of crypt epithelial cell proliferation and mucosal morphology induced by a T cell-mediated response in human small intestine. *Gastroenterology* **98**, 1255–1263.
- Dagci, H., Ustun, S., Taner, M.S., Ersoz, G., Karacasu, F. and Budak, S. (2002) Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta Tropica* **81**, 1–5.

- DAS, P., *et al.* (2012) Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: A new perspective. *Virchows Archiv* **460**(3), 261–270.
- Davin, J.C., Forget, P. and Mahieu, P.R. (1988) Increased intestinal permeability to (51Cr) EDTA is correlated with IgA immune complex-plasma levels in children with IgA-associated nephropathies. *Acta Paediatr Scand* **77** (1), 118–124.
- Demirci, M., Delibas, N., Altuntas, I., Oktem, F. and Yönden, Z. (2003) Serum Iron, Zinc and Copper Levels and Lipid Peroxidation in Children with Chronic Giardiasis. *J Health Popul Nutr* **21**(1), 72-75.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. and Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans of the Roy Soc of Trop Med and Hvg* **12**, 431-432.
- Dib, H.H., Lu, S.Q. and Wen, S.F. (2008) Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res* **103**, 239–251.
- Di Prisco, M.C., Hagel, I., Lynch, N.R., Jimenez, J.C., Rojas, R., Gil, M., Mata, E. (1998) Association between giardiasis and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* **81**, 261–265.
- Dobell, C. (1920) The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med* **13**, 1–15.
- Eckmann, L. (2003) Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology* **25**, 259-270.
- Erlandsen, S.L. and Bemrick, W.J. (1987) SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol* **73**(3), 623-9.
- Erlandsen, S. L., Bemrick, W.J. and Pawley, J. (1989) High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J Parasitol* **75**, 787–797.
- Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., Wells, C.L., Feely, D.E., Knudson, L., Campbell, S.R., van Keulen, H. and Jarroll, E.L. (1990a) Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol* **76**(5), 717-24.
- Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., Schupp, D.E., Shields, J.M., Jarroll, E.L., Sauch, J.F. and Pawley, J.B. (1990b) High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens

using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J Histochem Cytochem* **38**, 625–632.

Escobedo, A.A. and Nunez, F.A. (1999) Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. *Acta Trop* **72**, 125–130.

Esfandiari, A., Swartz, J. and Teklehaimanot, S. (1997) Clustering of giardiasis among AIDS patients in Los Angeles County. *Cell Mol Biol* **43**, 1077–1083.

Ey, P.L., Mansouri, M., Kulda, J., Nohýnková, E., Monis, P.T., Andrews, R.H. and Mayrhofer, G. (1997) Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukar Microbiol* **44**, 626–635.

Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., *et al.* (2000) Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52** (4): 513-56.

Farthing, M.J.G. (1989) Host parasite interactions in human Giardiasis. *Quart J Med* **70**, 191-204.

Farthing, M.J.G. (1993) Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges (pathogenesis of giardiasis). *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**, 17-21.

Farthing, M.J.G. (1997) The molecular pathogenesis of Giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **24**, 79–88.

Fasano, A. and Nataro, J.P. (2004) Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. *Adv Drug Deliv Rev* **56**, 795–807.

Faubert, G. (2000) Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* **13**, 35–54.

Feely, D.E., Schollmeyer, J.V. and Erlandsen, S.L. (1982) *Giardia*: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* **53**, 145-154.

Feng, Y., Xiao, L. (2011) Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* **24**, 110-40.

Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J. and Ellis, J. (2012) Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clin Microbiol Rev* **25**, 420–449.

Ferguson, A. (1976) Models of intestinal hypersensitivity. *Clin Gastroenterol* **5**, 271–288.

- Ferguson, A., Gillon, J. and Munro, G. (1990) Pathology and pathogenesis of the intestinal mucosal damage in giardiasis, p. 155–173. In E. A. Meyer (ed.), *Giardiasis*. Elsevier Publishing Co., New York, N.Y.
- Ferreira, R. C., Forsyth, L. E., Richman, P. I., Wells, C., Spencer, J. and MacDonald, T. T. (1990) Changes in the rate of crypt epithelial cell proliferation and mucosal morphology induced by a T-cell-mediated response in human small intestine. *Gastroenterology* **98**, 1255–1263.
- Ferreira, H., Lala, E.R.P., Monteiro, M.C., Raimundo, M.L. (2006) Estudo epidemiológico localizado da frequência e fatores de risco para enteroparasitoses e sua correlação com o estado nutricional de crianças em idade pré-escolar. *Rev. Univ. Est. Ponta Grossa: Ciências Biológicas e da Saúde* **12** (4), 33-40.
- Filice, F.P. (1952) Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool* **57**, 53–146.
- Fink, M.P., Antonsson, J.B., Wang, H., *et al.* (1991) Increased intestinal permeability in endotoxic pigs: Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. *Arch Surg* **126**, 211.
- Fink, M.Y. and Singer, S.M. (2017) The Intersection of Immune Responses, Microbiota and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends Parasitol* **33**(11), 901–913.
- Fonseca, J.F. (2015) Efeito de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em giardíase experimental. Belo Horizonte: MG. 83p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Ford, R.P., Menzies, I.S., Phillips, A.D., Walker-Smith, J.A. and Turner, M.W. (1985) Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **4** (4), 568–574.
- Gharagozloo M., Majewski, S. and Foldvari, M (2015) Therapeutic applications of nanomedicine in autoimmune diseases: From immunosuppression to tolerance induction, *Nanomedicine* **11**(4), 1003-18.
- Gendrel, D., Treluyer, J.M. and Richard-Lenoble, D. (2003) Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **17**(2), 189–197.

- Gil, F.F. (2011) Prevalência de enteroparasitoses em comunidades da periferia de Belo Horizonte: prevalência nos laboratórios vs. comunidades. Belo Horizonte: MG. 117p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Gil, F.F. (2016) Perfil Bioquímico, Hematológico e Imunológico de gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados por *Giardia lamblia*. Belo Horizonte: MG. 150p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Gillin, F.D., Reiner, D.S., Gault, M.J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A. and Sauch, J. (1987) Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* **235**, 1040- 1043.
- Gillin, F.D., Reiner, D.S. and Boucher, S.E. (1988) Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infect Immun* **56**, 705–7.
- Gillin, F.D., Boucher, S.E. and Reiner, D.S. (1989) *Giardia lamblia*: The roles of bile, lactic acid, and pH in completion of the life cycle in vitro. *Exp Parasitol* **69**, 164-174.
- Gillin, F.D., Reiner, D.S. and Mccaffery, J.M. (1996) Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 679–705.
- Goldin, A.J., Werner, A.P.T., Aguilera, X., Zulantay, I., Warhurst, D.C. and Milles, M.A.(1990) Efficient diagnosis of Giardiasis among nursery and primary school children in Santiago, Chile by capture ELISA for the detection of fecal *Giardia* antigens. *Am J Trop Med Hyg* **42**, 538-545.
- Gomes, M.A., de Oliveira, D.R., de Freitas, S.E., de Pinho Viana, M. and Borges, E.L. (2012) Effect of Giardiasis combined with low-protein diet on intestinal absorption of glucose and electrolytes in gerbils. *Exp Parasitol* **131**(4), 448-51.
- Gordis, L. (2000) Epidemiology. Saunders Company, 2^a ed. Phyladelphia.
- Gottstein, B., Stocks, N.I., Shearer, G.M. and Nash, T.E. (1991) Human cellular immune response to *Giardia lamblia*. *Infect* **19**:421–426.
- Goyal, N. and Shukla, G. (2013) Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis* infected BALB/c mice. *Dig Dis Sci* **58**, 1218–1225.

- Guk, S.M., Seo, M., Park, Y.K., Oh, M.D., Choe, K.W., Kim, J.L., Choi, M.H., Hong, S.T. and Chai, J.Y. (2005) Parasitic infections in HIV-infected patients who visited Seoul National University Hospital during the period 1995–2003. *Korean J Parasitol* **43**,1–5.
- Hailemariam, G., Kassu, A., Abebe, G., Abate, E., Damte, D., Mekonnen, E. and Ota, F. (2004) Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia. *Jpn J Infect Dis* **57**,41–43.
- Halliez, M.C. and Buret, A.G. (2013) Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol* **19**, 8974–8985.
- Hanevik, K., Hausken, T., Morken, M.H., Strand, E.A., Mørch, K., Coll, P., Helgeland, L. and Langeland, N. (2007). Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J Infect* **55**,524–30.
- Hanevik, K., Kristoffersen, E., Morch, K., Rye, K.P., Sornes, S., Svard S., Bruserud, O. and Langeland, N. *et al.* (2017) Giardia-specific cellular immune responses in post-giardiasis chronic fatigue syndrome. *BMC Immunol* **18**(5).
- Hardin, J.A., Buret, A.G., Oson, M.E., Kimm, M.H. and Gall, D.G. (1997) Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *J Parasitol* **83**, 908–912.
- Hare, D.F., Jarroll, E.L. and Lindmark, D.G. (1989) *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. *Exp Parasitol* **68**, 168–175.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R. and Rose, J.B. (2005) Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol* **71**(6), 3163 - 3170.
- Hawrelak, J. (2003) Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Altern Med Rev*, **8**(2), 129-142.
- Heyworth, M.F., Carlson, J.R. and Ermak, T.H. (1987) Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* **165**, 1743–1748.
- Heyworth, M.F. (1989) Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J Parasitol* **75**, 246–251.

- Hill, D.R., Guerrant, R.L., Pearson, R.D. and Hewlett, E.L. (1983) *Giardia lamblia* infection of suckling mice. *J Infect Dis* **147**, 217–221.
- Hofmann, A.F. and Roda, A. (1984) Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res* **25**, 1477-1489.
- Hollm-Delgado, M.G., Gilman, R.H., Bern, C., Cabrera, L., Sterling, C.R., Black, R.E. and Cheekley, W. (2008) Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. *Amp J Epidemiol* **168**, 647-655.
- Honma, J., Mitomi, H., Murakami, K., Igarashi, M. Saigenji, K. and Toyama, K. (2001) Nodular duodenitis involving CD8⁺ cell infiltration in patients with ulcerative colitis. *HepatoGastroent* **48**, 1604–1610.
- Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.D. and Thompson, R.C.A. (1997) Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* **83**, 44–51.
- Hopkins, R.M., Constantine, C.C., Groth, D.A., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A. and Thompson, R.C.A. (1999) PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitology* **118**, 531–539.
- Hörman, A., Korpela, H., Sutinen, J., Wedel, H., Hänninen, M.L. (2004) Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *Int J Parasitol* **34**(12), 1337-46.
- Horton, J.W. (1992) Alterations in intestinal permeability and blood flow in a new model of mesenteric ischemia. *Circ Shock* **36**,134.
- Humen, M.A., De Antoni, G.L., Benyacoub, J., Costas, M.E., Cardozo, M.I., Kozubsky, L., Saudan, K.Y., Boenzli-Bruand, A., Blum, S., Schiffrin, E.J. and Pérez, P.F. (2005) *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infect Immun* **73**, 1265–1269.
- Janeway, C.A. (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* **3**, 1167-71.
- Jensen, L.A., Marlin, J.W., Dyck, D.D. and Laubach, H.E. (2009) Prevalence of multi-gastrointestinal infections with helminth, protozoan and *Campylobacter* spp. in Guatemalan children. *J Infect Dev Ctries* **3**, 229–234.

- Jimenez, J.C., Fontaine, J., Grzych, J.M., Dei-Cas, E. and Capron, M. (2004) Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**, 152–160.
- Jorgensen, V.L., Nielsen, S.L., Espersen, K. and Perner, A. (2006) Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* **32**, 1790–1796.
- Jones, E. G. and Brown, W.R. (1974) Serum and intestinal fluid immunoglobulins in patients with giardiasis. *Am J Dig Dis* **19**, 791–797.
- Júnior, M.F., Batista, S.A., Barbuto, R.C., Gomes, A.D., Queiroz, D.M., Araújo, I.D. and Caliari, M.V. (2016) CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites produces increase of G cell and decrease of D cell in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Advances in Medical Sciences* **61**(2), 231-236.
- Keister, D.B. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans of The Roy Soc of Trop Med and Hyg* **77**(4), 487–488.
- Kodama, M., Murakami, K. and Fujioka, T. (2004) Animal models for the study of *Helicobacter*-induced gastric carcinoma. *Journal of Infection and Chemotherapy* **10**(6), 316-25.
- Kohli, A., Bushen, O.Y., Pinkerton, R.C., Houpt, E., Newman, R.D., Sears, C.L., Lima, A.A., Guerrant, R.L. (2008) *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102** 718–725.
- Koot, B.G.P., ten Kate, F.J.W., Juffrie, M., Rosalina, I., Taminiau, J.J.A.M. and Benninga, M.A. (2009) Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **49**(3), 304-308.
- Kunstler, J. (1882) Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* **95**, 347–349.
- Laishram, S., Kang, G. and Ajjampur, S.S.R. (2012) Giardiasis: A review on assemblage distribution and epidemiology in India. *Indian J Gastroenterol* **31**(1),3–12.

- Lambl W. (1859) Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr Prakt Heikunde* **61**, 1–58.
- Lane, S. and Lloyd, D. (2002) Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* **28**,123–147.
- Langford, T.D., Housley, M.P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M.F., Gillin, F.D., Eckmann, L. (2002) Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infection and Immunity* **70**, 11–18.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D.M., Sogin, M.L. (2010) The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* **40**, 1063-1074.
- Leitch, G.J., *et al* (1989) Dietary fiber and giardiasis: dietary fiber reduces rate of intestinal infection by *Giardia lamblia* in the gerbil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **41**, 512–520.
- Li, E. *et al.* (2006) Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *J Immunol* **176**, 516–521.
- Lindo, J.F., Dubon, J.M., Ager, A.L., De Gourville, E.M.H., Solo-Gabriele, Klaskala, W.I.M., Baum, K. and Palmer, C.J. (1998) Intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals in San Pedro Sula, Honduras. *Am J Trop Med Hyg* **58**, 431–435.
- Lionetti, P., Breese, E., Braegger, C.P., Murch, S.H., Taylor, J. and MacDonald, T.T. (1993) T-cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. *Gastroenterology* **105**, 373–381.
- Lopez-Romero, G., Quintero, J., Astiazarán-García, H. and Velazquez, C. (2015) Host defences against *Giardia lamblia*. *Paras Immunology* **37**(8), 394–406.
- Lujan, H.D. and Touz, M.C. (2003) Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology* **5**, 427–434.
- Lunn, P.G., Erinoso, H.O., Northrop-Clewes, C.A. and Boyce, S.A. (1999) *Giardia intestinalis* is unlikely to be a major cause of the poor growth of rural Gambian infants. *J Nutr* **129** (4), 872–877.

Manson-Smith, D.F., Bruce, R.G. and Parrott, D.M.V. (1979) Villous atrophy and expulsion of *Trichinella spiralis* are mediated by T-cells. *Immunology* **47**, 285–292. 32.

Mariano, A.P.M (2014). Prevalência de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia lamblia* em crianças menores de 6 anos em creches/pré-escolas de zona urbana de um município do interior da Bahia, Brasil. Ribeirão Preto: SP. 102p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Enfermagem e Saúde pública. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Univ. de São Paulo. São Paulo.

Mason, P.R. and Patterson, B.A. (1987) Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *Am J Trop Med Hyg* **37**(2), 277-82.

Matti, V.L.T (2009) Efeitos da dexametasona e pentoxifilina na esquistossomose mansoni experimental: aspectos do parasitismo e histopatologia hepática em camundongos da linhagem AKR/J. Belo Horizonte: MG. 159p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Matowicka-Karna, J., Dymicka-Piekarska, V. and Kemonia H. (2009) IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochem Cytobiol* **47**, 93–97.

Melo, A.L., Hermeto, M.V., Bicalho, R.S., Vargas, A.P., Favaretto, F.J. and Pereira, L.H. (1994) *Schistosoma mansoni*: the effect of dexamethasone on the cercaria schistosomulum transformation *in vivo*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **36**,89-93.

Menezes, A.I., Lima, V.M.P., Freitas, M.T.S., Rocha, M.O., Silva, E.F. and Dolabella, S.S. (2008) Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* **50**, 57-59.

Mohandas, K., Sehgal, R., Sud, A. and Malla, N. (2002) Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India. *Jpn J Infect Dis* **55**,83–84.

Mondal, D., Haque, R., Sack, R.B., Kirkpatrick, B.D. and Petri, W.A. Jr. (2009) Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of

preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**(5), 824–826.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Kulda, J., Isaac-Renton, J.L. and Ey, P.L. (1998) Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology* **116**, 7–19.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. and Ey, P.L. (1999) Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol E* **16**, 1135–1144.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. and Ey, P.L. (2003a) Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* **3**:29–38.

Monis, P.T., Thompson, R.C.A., (2003b) *Cryptosporidium* and *Giardia* zoonoses: fact or fiction?. *Infect Genet Evol* **3**, 233–244.

Monis, P.T., *et al.* (2009) Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* **25**, 93–100.

Moolasart, P. (1999) *Giardia lamblia* in AIDS patients with diarrhea. *J Med Assoc Thailand*. **82**, 654–659.

Morken, M.H., Valeur, J., Norin, E., Midtvedt, T., Nysaeter, G., Berstad A. (2009) Antibiotic or bacterial therapy in post-Giardiasis irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* **44** 1296–1303.

Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E., Palm, D., Passamaneck, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G., Sogin, M.L. (2007) Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**, 1921–1926.

Morson and Dawson (2003) Inflammatory disorders of the small intestine. *Gastroint Pathology*. 4th ed. Stoneham, MA: Blackwell Science, 283–284.

Mukhopadhyay, C., Wilson, G., Pradhan, D. and Shivananda, P.G. (2007) Intestinal protozoal infestation profile in persistent diarrhea in children below age 5 years in western Nepal. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **38**(1), 13–19.

- Muller, S., Lory, J., Corazza, N., Griffiths, G.M., Z'graggen, K., Mazzucchelli, L., Kappeler, A. and Mueller, C. (1998) Activated CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* **152**, 261–268.
- Muller, N. and von Allmen, N. (2005) Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol* **35**, 1339–1347.
- Nair, K.V., Gillon, J. and Ferguson, A. (1981) Corticosteroid treatment increases parasite numbers in murine giardiasis. *Gut* **22**, 475–480.
- Nash, T.E., Banks, S.M., Alling, D.W., Merritt, J.W. and Conrad, J.T. (1990) Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* **71**, 415–421.
- Nash, T.E. (1997) Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **352**, 1369–1375.
- Neves, D.P., Melo, A.L., Linard, P.M. and Vitor, R.W.A. (2011) *Parasitologia Humana*. 11^a ed. *Atheneu São Paulo*, 494 p.
- Niehaus, M.D., Moore, S.R., Patrick, P.D., Derr, L.L., Lorntz, B., Lima, A.A., Guerrant, R.L. (2002) Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg* **66**(5), 590–593.
- Noone, C., Menzies, I.S., Banatvala, J.E. and Scopes, J.W. (1985) Intestinal permeability and lactose hydrolysis in human rotaviral gastroenteritis assessed simultaneously by non-invasive differential sugar permeation. *Eur J Clin Invest* **16** (3), 217–225.
- Noureldin, M.S., Shaltout, A.A., El Hamshary, E.M. and Ali, M.E. (1999) Opportunistic intestinal protozoal infections in immunocompromised children. *J Egypt Soc Parasitol.* **29**, 951–961.
- Nussler, N.C., Stange, B., Hoffman, R.A., Schraut, W.H., Bauer, A.J. and Neuhaus, P. (2000) Enhanced cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in patients with Crohn's disease. *Langenbecks Arch Surg* **385**, 218–224.
- Oberhuber, G., Kastner, N. and Stolte, M. (1997) Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol* **32**, 48–51.

- O'Hara, J.R. and Buret, A.G. (2008) Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front Biosci* **13**, 7008–7021.
- Oliveira, F.M.S., Horta, B.C., Prata, L.O., Santiago, A.F., Alves, A.C., de Faria, A.M.C, Gomes, M.A. and Caliari, M.V. (2012) Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. *Cur Infect Dis Rep* **4**, 106-113.
- Olmez, S., Aslan, M., Yavuz, A., Bulut, G. and Dulger, A.C. (2014) Diffuse nodular lymphoid hyperplasia of the small bowel associated with common variable immunodeficiency and Giardiasis: a rare case report. *Wiener klinische Wochenschrift* **126**, 294–297.
- Ostan, I., Kilimcioglu, A.A., Girginkardes, N., Ozyurt, B.C., Eminlimoncu, M., Ulgen, Z. (2007) Health inequities: lower socio-economic conditions and higher incidences of intestinal parasites. *BMC Public Health* **7**, 342.
- Ostrosky-Zeichner, L., Soto-Hernandez, J.L., Angeles-Morales, V., Teixeira, F. Nava-Ruiz, C., Rios, C., Solis, F. and Sotelo, J. (1996) Effects of Pentoxifylline or Dexamethasone in Combination with Amphotericin B in Experimental Murine Cerebral Cryptococcosis: Evidence of Neuroexcitatory Pathogenic Mechanisms. *Amer Soc Microb* **40**, 1194–1197.
- Ortega, Y.R. and Adam, R.D. (1997) *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis* **25**(3), 545–550.
- Otamiri, T., Sjudahl, R. and Tagesson, C. (1987) An experimental model for studying reversible intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* **153**, 51, 1987.
- Paget, T.A., Macechko, P.T. and Jarroll, E.L. (1998) Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during differentiation. *J Parasitol* **84**, 222–226.
- Piva, B. and Benchimol, M. (2004) The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell* **96**, 735-746.
- Plutzer, J., Ongerth, J. and Karanis I.P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* **213**, 321–333.

Prasad, K.N., Nag, V.L., Dhole, T.N. and Ayyagari, A. (2000) Identification of enteric pathogens in HIV-positive patients with diarrhoea in northern India. *J Health Popul Nutr* **18**,23–26.

Quihui-Cota, L., León-Trujillo, R., Astiazarán-García, H., Esparza-Romero, J., del Refugio R.M., Robles-Zepeda, R.E., Canett, R. and Sánchez-Escalante, J. (2014) Marked anti-Giardial activity of *Yucca baccata* extracts: a potential natural alternative for treating protozoan infections. *Biomed Res Int* **823**, 492.

Quirino, I.E.P., Cardoso, V.N., Santos, R.G.C., *et al.* (2013) The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. *J Parenter Enteral Nutr* **37**, 392-400.

Ratanapo, S., Mungthin, M., Soontrapa, S., Faithed, C., Siripattanapipong, S., Rangsin, R., Naaglor, T., Piyaraj, P., Taamasri, P. and Leelayoova, S. (2008) Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **78**, 611–615.

Rezende, J.M. (2011) Linguagem médica: imunossupressão e imunodepressão. *Rev de Patol Tropic* **40** (2): 199-201.

Resnick, R.H., Royal, H., Marshall, W., Barron, R. and Werth, T. (1990) IP in gastrointestinal disorders. Use of oral ^{99m}Tc-DTPA. *Dig Dis Sci* **35** (2), 205–211.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J. and Henderson, G. *Farmacologia* 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Ribeiro, M.R.S., Oliveira, D.R., Oliveira, F.M.S., Caliari, M.V., Martins, F.S., Nicoli, J.R., Torres, M.F., Andrade, M.E.R., Cardoso, V.N. and Gomes, M.A (2018) Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* in experimental giardiasis. *Beneficial Microbes* **9**, 789-797.

Rivero, F.D., Saura, A., Prucca, C.G., Carranza, P.G., Torri, A. and Luján, H.D. (2010) Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med* **16**, 551–557.

Roy, S.K., Buis, M., Weersma, R., Khatun, W.S., Chowdhury, S., Begum, A., Sarker, D., Thakur, S.K. and Khanam, M. (2011) Risk factors of mortality in severely-malnourished

children hospitalized with diarrhoea. *Journal of Health Population and Nutrition* **29**(3), 229-235.

Robertson, L.J., Hanevik, K., Escobedo, A.A., Morch, K. and Langeland, N. (2010) Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol* **26**, 75–82.

Roxstrom-Lindquist, K., Ringqvist, E., Palm, D. and Svard, S. (2005) *Giardia lamblia* induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **73**, 8204–8208.

Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., Svard, S.G., Russell, D.H., Barreto, J.C., Klemm, K., *et al* (2006) Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat. *Shock* **4**, 50.

Ryan, C.M., Bailey, S.H., Carter, E.A., *et al.* (1994) Additive effects of thermal injury and infection on gut permeability. *Arch Surg* **125**, 325.

Saki, J., Khademvatan, S., Maraghi, S., Soltani, S. (2011) Serum lipid profiles and eosinophilia among *Giardia* cyst passers. *African Journal of Microbiology Research* **5**(27), 4881-4884.

Salzman, A.L., Menconi, M.J., Unno, N., *et al.* (1995) Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* **268**, 361.

Sato, M.I.Z., Galvani, A.T., Padula, J.A., Nardocci, A.C., Lauretto, M.S., Razzolini, M.T.P., and Hachich, E.M. (2013) Assessing the infection risk of *Giardia* and *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment* **442**, 389-396.

Savioli, L., Smith, H. and Thompson, R.C.A. (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends Parasitol* **22**, 203-208.

Serradell, M.C., Gargantini, P.R., Saura, A., Oms, S.R., Rupil, L.L., Berod, L., Sparwasser, T., Luján, H.D. (2018) Cytokines, antibodies and histopathological profiles during *Giardia* infection and VSP-based vaccination. *Infect Immun* **86**(6), e00773-17.

Schleimer, R.P. (2004) Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 222-230.

- Scott, K.G., Logan, M.R., Klammer, G.M., Teoh, D.A. and Buret, A.G. (2000) Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun* **68**, 3412–3418.
- Scott, K.G., Meddings, J.B., Kirk, D.R., Lees-Miller, S.P. and Buret, A.G. (2002) Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* **123**, 1179–1190.
- Scott, K.G., Yu, L.C. and Buret, A.G. (2004) Role of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* **72**, 3536–3542.
- Smith, P.D., Gillin, F.D., Spira, W.M. and Nash, T.E. (1982) Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology* **83** (4), 797–803.
- Smith, H.V., Caccio, S.M., Tait, A., McLauchlin, J. and Thompson, R.C.A. (2006) Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology* **22**(4), 160-167.
- Snider, D.P., Gordon, J., McDermott, M.R. and Underdown, B.J. (1985) Chronic *Giardia muris* infection in anti-IgM-treated mice. I. Analysis of immunoglobulin and parasite-specific antibody in normal and immunoglobulin-deficient animals. *J Immunol* **134**: 4153–4162.
- Snider, D.P. and Underdown, B.J. (1986) Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. *Infect Immun* **52**: 271–278.
- Snider, D.P., Skea, D. and Underdown, B.J. (1988) Chronic giardiasis in Bcell- deficient mice expressing the xid gene. *Infect Immun* **56**: 2838–2842.
- Singer, S.M. and Nash, T.E. (2000) T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* **68**, 170–175.
- Singer, S.M. (2015) Control of giardiasis by interleukin-17 in humans and mice – are the questions all answered? *Clin Vaccine Immunol* **23**, 2–5.

- Siwila, J., Phiri, I.G., Enemark, H.L., Nchito, M. and Olsen, A. (2010) Intestinal helminths and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **104**, 122-128.
- Solari, A.J., Rahn, M.I., Saura, A. and Lujan, H.D. (2003) A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell* **27**, 329-346.
- Solaymani-Mohammadi, S. and Singer, S.M. (2010) *Giardia duodenalis*: The double-edge sword of immune responses in giardiasis. *Experimental parasitology* **126**: 92-297.
- Solaymani-Mohammadi, S. and Singer, S.M. (2011). Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J Immunol* **187** (7), 3769-3775.
- Stadelmann, B. *et al.* (2012) Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PLoS One* **7**, e45325.
- Stager, S. and Muller, N. (1997) *Giardia lamblia* infections in B-cell deficient transgenic mice. *Infect Immun* **65**: 3944–3946.
- Stark, D., Fotedar, R., van Hal, S., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J.T. and Harkness, J. (2007) Prevalence of enteric protozoa in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative men who have sex with men from Sydney, Australia. *Am J Trop Med Hyg* **76**, 549–552.
- Stark, D., Barratt, J.L.N., van Hal, S., Marriott, D., Harkness, J. and Ellis, J.T. (2009) Clinical significance of enteric protozoa in immunosuppressed human population. *Clin Microbiol* **22**, 634-650.
- Swank, G.M. and Deitch, E.A. (1996) Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World Journal of Surgery* **20**, 411-417.
- Tafazoli, F., Magnusson, K.E. and Zheng, L. (2003) Disruption of epithelial barrier integrity by *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* requires geranylgeranylated proteins. *Infect Immun* **71**, 872–881.

Tako, E.A., Hassimi, M.F., Li, E. and Singer, S.M. (2013) Transcriptomic analysis of the host response to *Giardia duodenalis* infection reveals redundant mechanisms for parasite control. *MBio* **4**, e00660–e00613.

Tejman-Yarden. N., Miyamoto, Y., Leitsch, D., Santini, J., Debnath, A., Gut, J., McKerrow, J.H., Reed, S.L. and Eckmann, L. (2013) A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**(5), 2029-35.

Teahon, K., Webster, A.D., Price, A.B., *et al.* (1994) Studies on the enteropathy associated with primary hypogammaglobulinaemia. *Gut* **35**, 1244–1249.

Teoh, D.A., Kamieniecki, D., Pang, G. and Buret, A.G. (2000) *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. *J Parasitol* **86**, 800–806.

Thompson, R.C.A. (2000) Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol* **30**, 1259–1267.

Thompson, R.C, and Monis, P. (2012) *Giardia*-from genome to proteome. *Adv Parasitol* **78**,57-95.

Tomita, M., Ohkubo, R. and Hayashi, M. (2004) Lipopolysaccharide transport system across colonic epithelial cells in normal and infective rat. *Drug Metab Pharmacokinet* **19**, 33–40.

Troeger, H., Epple, H.J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J.D. (2007) Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* **56**, 328–335.

Ungar, B.L.P., Yolken, R.H., Nash, T.E. and Quinn, T.C. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *Journal of Infectious Diseases* **149**, 90-97.

Unno, N., Mitchell, P. and Fink, M.P. (1998) Intestinal epithelial hyperpermeability: Mechanisms and Relevance to Disease. *Clinic Nut* **27**, 2.

van Keulen, H., Freely, D.E., Macechko, P.T., Jarroll, E.L., Erlandsen, S.L. (1998) The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. *J Parasitol* **84**, 294–300.

- Venkatesan, P., Finch, R.G. and Wakelin, D. (1997) A comparison of mucosal inflammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol* **19**, 137–143.
- Ventura, L.L.A., Oliveira, D.R., Viana, J.C., Santos, J.F., Caliari, M.V. and Gomes, M.A. (2013) Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* **133**(4), 391-5.
- Ventura, L.L.A. (2016) Influência da obesidade sobre a infecção experimental de Gerbils (*Meriones unguiculatus*) com *Giardia lamblia*. Belo Horizonte: MG. 132p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Vinayak, V.K., Khanna, R. and Kum, K. (1991) Kinetics of intraepithelium and lamina propria lymphocyte responses during *Giardia lamblia* infection in mice. *Microb Pathog* **10**, 343–350.
- Wachtler, P., Hilger, R.A., Konig, W., Baure, K.H., Kemen, M. and Koller, M. (1995) Influence of a pre-operative enteral supplement on functional activities of peripheral leukocytes from patients with major surgery. *Clinical Nutrition* **4**, 275-282.
- Ward, H., Jalan, K.N., Maitra, T.K., *et al.* (1983) Small intestinal nodular lymphoid hyperplasia in patients with giardiasis and normal serum immunoglobulins. *Gut* **24**, 120–6.
- Webster, A.D.B. (1980) Giardiasis and immunodeficiency diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **74**, 440–443.
- WHO/PAHO – World Health Organization (1991) Informal consultation on intestinal protozoal infections. Mexico.
- WHO – World Health Organization (2005) Report of the third global meeting of the partners for parasite control: Deworming for Health and Development. Geneva. 53pp.
- Williams, A.G. and Coombs, G.H. (1995) Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. *Int J Parasitol* **25**, 771–778.
- Williams L. and Wilkins (1999) Nonneoplastic lesions of the small intestine. In: Fenoglio-Preiser CM, ed. *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text*. Philadelphia, 395.
- Wolfe, M.S. (1992) Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* **5**, 93–100.

Wright, S.G. and Tomkins, A.M. (1977) Quantification of the lymphocytic infiltrate in jejunal epithelium in giardiasis. *Clin Exp Immunol* **29**, 408–12.

Wright, S.G., Tomkins, A.M. and Ridley, D.S. (1977) Giardiasis: clinical and therapeutic aspects. *Gut* **18**, 343–50.

Zali, M.R., Mehr, A.J., Rezaian, M., Meamar, A.R., Vaziri, S. and Mohraz, M. (2004) Prevalence of intestinal parasitic pathogens among HIV positive individuals in Iran. *Jpn J Infect Dis* **57**, 268–270.

Zinneman, H.H. and Kaplan, A.P. (1972) The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Am J Dig Dis* **17**, 793– 799.

Anexos

9. ANEXOS

ANEXO 1

Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFMG



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Permeabilidade intestinal e alterações patológicas resultantes de desnutrição, imunossupressão e infecção experimental por *Giardia lamblia* no modelo *Meriones unguiculatus*", protocolo do CEUA: 254/2016 sob a responsabilidade de Maria Aparecida Gomes que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 06/09/2016.

Vigência do Projeto	14/09/2016 a 14/09/2018
*Espécie/linhagem	Gerbil383
Nº de animais	9
Peso/Idade	45g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG
*Espécie/linhagem	Gerbil384
Nº de animais	9
Peso/Idade	45g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG
*Espécie/linhagem	Gerbil385
Nº de animais	9
Peso/Idade	45g / 4(semanas)
Sexo	masculino

Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas
*Espécie/linhagem	Gerbil386
Nº de animais	9
Peso/Idade	45g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas
*Espécie/linhagem	Gerbil387
Nº de animais	9
Peso/Idade	45g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas- ICB UFMG

Considerações posteriores:

06/09/2016	Aprovado na reunião do dia 05/09/2016.
------------	--

Belo Horizonte, 08/09/2016. Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br