

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Efeito de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em
giardíase experimental

Belo Horizonte – MG

2015

Joice de Freitas Fonseca

Efeito de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em giardiase experimental

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

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes

Coorientação: Profa. Dra. Elisabeth Neumann

Belo Horizonte – MG

2015

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

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 doce memória dos meus avós, José e Hercília;

Aos meus pais, por tonarem possível a realização deste sonho;

*À minha querida amorinha Bebel, pelo carinho, afeto e
cumplicidade.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao programa de Pós Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa de sua coordenadora Professora Doutora Érica Martins Braga, pela oportunidade concedida, pela confiança, pela formação e aprendizado, e por facilitar a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Maria Aparecida Gomes, pela preciosa orientação, oportunidade, carinho, atenção e por me incentivar a enxergar além, despertando em mim a curiosidade e o deslumbramento sobre um tema, a Giardíase;

A minha co-orientadora Elisabeth Neumann pela disponibilidade, ensinamentos e apoio fundamental para concretização deste trabalho;

Ao professor Marcelo, pelos ensinamentos e prestatividade dados prontamente sempre que solicitado;

Aos queridos Joãozinho, Edna e Carlos, profissionais ímpares que me auxiliaram, sobretudo na construção do aprendizado científico, sempre com palavras encorajadoras, conselhos oportunos e paciência;

Aos meus queridos colegas de laboratório, especialmente Michele, Fabrício, Luana, Luciana, Frederico, pelo auxílio, companheirismo e por fazerem do dia-a-dia tão alegres e divertidos;

À Thata minha conselheira risonha, pela grande amizade dentro e fora do laboratório;

À Aline, pela doce amizade, incentivo, conselhos sábios e a alegria da convivência;

À “Turma do Naldo”, vocês fizeram toda diferença, me presenteando com inúmeras boas lembranças;

Ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, nas pessoas dos professores Jcques Nicolí e Flaviano Martins pela colaboração;

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

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudos;

A todos que de maneira direta ou indiretamente participaram para realização deste trabalho, colaborando para meu crescimento pessoal e profissional;

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Resumo dos principais mecanismos de ação dos probióticos. PB: probiótico; PG: patógeno; CEI: célula epitelial intestinal; CD célula dendrítica; MO: macrófago..... | 33 |
| Figura 2: Altura das criptas intestinais (duodeno) (μm) dos grupos experimentais..... | 50 |
| Figura 3: Altura das vilosidades intestinais (duodeno) (μm) dos grupos experimentais..... | 51 |
| Figura 4: Relação entre criptas e vilosidades intestinais (duodeno) dos grupos experimentais..... | 52 |
| Figura 5: Fotomicrografia de imuno-histoquímica para trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> | 53 |
| Figura 6: Número de trofozoítos no intestino delgado (duodeno) dos grupos experimentais..... | 54 |
| Figura 7: Fotomicrografia do intestino delgado dos grupos experimentais..... | 55 |
| Figura 8: Área de muco na mucosa duodenal dos animais dos grupos experimentais..... | 56 |

LISTA DE ABREVEATURAS

ANOVA: Análise de Variância

BLc: Grupo *Bifidobacterium longum* sem infecção

BLi: Grupo *Bifidobacterium longum* com infecção

Cc: Grupo controle sem infecção

CI: Grupo controle infecção

CWPs: Proteínas da parede do cisto

ESV: Vesículas secretórias específicas da encistação

GALNAC: N-acetilgalactosamina

H&E: Hematoxilina e Eosina

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ID: Intestino Delgado

IFN- γ : Interferón gama

IgA: Imunoglobulina A

IgM: Imunoglobulina M

IL-10: Interleucina 10

IL-2: Interleucina 2

LAPI: Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais

LGMPP: Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas

MRS: Ágar De Man, Rogosa e Sharpe

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAS: Ácido Periódico de Schiff

PBS: Solução Salina Tamponada

rRNA: RNA ribossomal

SLU: Serviço de Limpeza Urbana

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VSP: Proteína de superfície variante

WPC: Grupo *Weissella paramesenteroides* sem infecção

WPI: Grupo *Weissella paramesenteroides* com infecção

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS..... | 9 |
| LISTA DE ABREVEATURAS | 10 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1. <i>Gênero Giardia</i> | 18 |
| 1.1.1. <i>Taxonomia</i> | 18 |
| 1.1.2. <i>Caracterização Genética</i> | 19 |
| 1.1.3. <i>Diferenciação celular</i> | 20 |
| 1.1.4. <i>Manifestações Fisiopatológicas e Clínicas</i> | 26 |
| 1.1.5. <i>Epidemiologia da Giardíase</i> | 28 |
| 1.1.6. <i>Tratamento</i> | 29 |
| 1.2. <i>Probióticos</i> | 30 |
| 1.2.1. <i>Definição</i> | 30 |
| 1.2.2. <i>Mecanismos de ação dos probióticos</i> | 32 |
| 1.2.3. <i>Gênero Bifidobacterium</i> | 34 |
| 1.2.4. <i>Gênero Weissella</i> | 35 |
| 1.3. <i>Modelo experimental para giardíase</i> | 36 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 39 |
| 3. OBJETIVOS..... | 42 |
| 3.1 <i>Geral</i> | 42 |
| 3.2 <i>Específicos</i> | 42 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1. <i>Modelo Experimental</i> | 44 |
| 4.2. <i>Divisão de Grupos e Delineamento Experimental</i> | 44 |
| 4.3 <i>Micro-organismos</i> | 45 |
| 4.4. <i>Administração de B. longum 5^{1A}, W. paramesenteroides WpK4 e G. lamblia aos respectivos grupos experimentais</i> | 45 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.5. | <i>Ajuste do inóculo de G. lamblia para infecção experimental</i> | 46 |
| 4.6. | <i>Necropsia dos animais e coleta de materiais</i> | 46 |
| 4.7. | <i>Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal</i> | 47 |
| 4.7.1. | <i>Análise quantitativa do comprimento de vilosidades e área de muco</i> | 47 |
| 4.7.2. | <i>Reação imunohistoquímica e análise quantitativa para trofozoítos</i> | 48 |
| 4.8. | <i>Análise estatística</i> | 49 |
| 5. | RESULTADOS | 51 |
| 5.1. | <i>Análise quantitativa da altura das criptas duodenais</i> | 51 |
| 5.2. | <i>Análise quantitativa da altura das vilosidades intestinais</i> | 52 |
| 5.3. | <i>Análise da relação criptas intestinais e vilosidades intestinais</i> | 53 |
| 5.4. | <i>Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos trofozoítos</i> | 54 |
| 5.5. | <i>Análise qualitativa e quantitativa da mucosa duodenal PAS positiva</i> | 56 |
| 6. | DISCUSSÃO | 60 |
| 7. | CONCLUSÕES | 68 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 70 |

RESUMO

A giardíase é uma doença causada pelo protozoário *Giardia lamblia*, um parasito patogênico não invasivo que infecta anualmente 280 milhões de indivíduos em todo o mundo. A introdução de probióticos na terapêutica de diversas doenças têm aumentado nas últimas décadas em função dos benefícios gerados na saúde do hospedeiro. Grande parte das linhagens probióticas com propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras comprovadas, são bactérias ácido-láticas que em microaerofilia. Diante do exposto, decidimos avaliar a ação de probióticos sobre *Giardia lamblia* em infecções experimentais. Os probióticos estudados foram *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4, esta última recém-isolada e ainda em fase de comprovação de sua função probiótica. Utilizaram-se 60 gerbils, machos e fêmeas, distribuídos em 6 grupos: *B. longum* 5^{1A} com *Giardia* (BLi); grupo *B. longum* 5^{1A} sem *Giardia* (BLc); grupo *W. paramesenteroides* com *Giardia* (WPI); grupo *W. paramesenteroides* sem *Giardia* (WPC); grupo controle infecção (Ci); grupo controle (Cc). Os animais receberam os probióticos (*B. longum* 5^{1A} ou *W. paramesenteroides* WpK4), salina a 0,9%, na quantidade de 0,1mL diariamente, e suspensão de *Giardia lamblia* via gavagem,. Após 10 dias de tratamento diário com os probióticos os animais dos grupos BLi, WPI e Ci, foram infectados com *G. lamblia* e eutanasiados no décimo sétimo dia após o início do experimento. Para análise histológica, a porção duodenal do intestino delgado foi coletada, fixada e destinada à obtenção de cortes corados com H & E e PAS. A altura das vilosidades, das criptas, a relação criptas/vilosidades, área de muco e área de trofozoítos imunomarcados, foram calculadas através do software KS300 instalado no analisador de imagens Carl Zeiss. Os resultados foram produzidos com o software GraphPad Prism® 4 (GraphPad Software Inc.). Em todos os testes foram considerados como diferenças estatísticas os valores com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). A altura das criptas intestinais apresentou aumento significativo nos grupos infectados (Ci), (BLi) e (WPI) em relação aos outros grupos experimentais. Observamos que a relação cripta/vilosidade foi significativamente maior nos grupos infectados (Ci), (BLi) e (WPI) quando comparados aos demais. A análise da área de trofozoítos imunomarcados demonstrou redução significativa no número de trofozoítos dos grupos BLi e WPI em relação ao grupo Ci. Quanto a área de PAS positivo observamos que no grupo BLi as regiões PAS positiva nas criptas e vilosidades foi significativamente maior em relação aos grupos BLc, WPC, WPI. Este trabalho demonstrou que a administração de bactérias probióticas (*B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides*) reduziu a carga parasitária dos animais infectados com *G. lamblia*.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*; Probióticos; *Bifidobacterium longum*; *Weissella paramesenteroides*

ABSTRACT

Giardiasis is a disease caused by the protozoan *Giardia lamblia*, non-invasive pathogenic parasite that infects 280 million people annually worldwide. The introduction of probiotics in the treatment of various diseases have increased in recent decades due to the benefits generated in the health of the host. Much of the probiotic strains with antimicrobial properties and immunomodulatory proven, are lactic acid bacteria that in microaerophilic. Given the above, we decided to evaluate the effect of probiotics on *Giardia lamblia* in experimental infections. Probiotics *Bifidobacterium longum* 5^{1A} were studied and *Weissella paramesenteroides* WpK4, this very last newly isolated and still in evidence phase of its probiotic function. We used 60 gerbils, males and females, divided into 6 groups: *B. longum* 5^{1A} with Giardia (BLi); group *B. longum* 5^{1A} without Giardia (BLC); *W. paramesenteroides* group with Giardia (WPI); *W. paramesenteroides* group without Giardia (WPC); infection control group (C); control group (CC). Animals received probiotic (*B. longum* 5^{1A} or *W. paramesenteroides* WpK4), 0.9% saline in the amount of 0.1 mL daily, and *Giardia lamblia* suspension by gavage. After 10 days of daily treatment with probiotics groups of animals BLi, WPI and Ci were infected with *G. lamblia* were euthanized on the seventeenth day after initiation of the experiment. For histological analysis, the duodenum of the small intestine was collected, fixed and designed to obtain sections stained with H & E and PAS. The villus height, crypt, the relationship crypt / villus, mucus area and area of immunostained trophozoites were calculated using the software installed in KS300 by Carl Zeiss image analyzer. The results were generated with GraphPad PRISM® 4 software (GraphPad Software Inc.). In all tests were considered statistical difference values with significance level of 5% (p <0.05). The height of the intestinal crypts increased significantly in infected groups (Ci), (BLi) and (WPI) compared to the other experimental groups. We observed that the relationship crypt / villus was significantly higher in the infected group (Ci), (BLi) and (WPI) when compared to the others. The analysis of trophozoites immunomarked area showed a significant reduction in the number of trophozoites BLi and WPI groups in relation to Ci group. As for PAS positive area observed that in the group BLi the positive PAS regions in the crypts and villi was significantly higher compared to BLC groups, WPC, WPI. This study demonstrated that administration of probiotic bacteria (*B. longum* 5^{1A} and *W. paramesenteroides*) reduced the animal load infected with *G. lamblia*.

Keywords: *Giardia lamblia*; Probiotic; *Bifidobacterium longum*; *Weissella paramesenteroides*

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A primeira observação do protozoário integrante do gênero *Giardia* foi realizada em 1681 pelo comerciante Holandês Antonie van Leeuwenhoek em seu microscópio. No entanto, somente em 1970, período marcado pelo aumento número de indivíduos com sintomas de giardíase regressantes das visitas na União Soviética, houve atenção dos cientistas quanto ao fato coincidente dos viajantes e das manifestações clínicas direcionadas à *Giardia*. Desde então, *Giardia lamblia* (sinonímia *G. duodenalis* e *G. intestinalis*) continua sendo um dos parasitos mais prevalentes em todo o mundo, responsável por disfunções gastrointestinais em humanos, sobretudo crianças de idade escolar.

A sobrevivência do parasito no ambiente é prolongada e a dose para infecção é relativamente baixa – 10 cistos. Para animais jovens da zona-rural, considera-se um forte patógeno zoonótico, capaz de gerar grandes perdas econômicas (Thompson, 2000; Monis et al, 2009; Walzer et al, 1971; O’Handley et al, 2001).

Em setembro de 2004, a giardíase, em função de seu potencial zoonótico e propagação antroponótica, foi incluída no rol das Doenças Tropicais Negligenciadas, grupo delimitado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), composto por enfermidades causadas por agentes infecciosos, como bactérias, vírus e protozoários (Savioli et al, 2006). Essas doenças têm uma forte correlação com áreas onde o crescimento populacional desordenado não é acompanhado por melhorias das condições de infraestrutura, sobretudo relacionadas ao tratamento de água e esgoto (Thompson, 2000; Snel et al, 2009).

Estima-se que ocorram anualmente, em todo o mundo, cerca de 280 milhões de casos humanos de giardíase (Lane & Lloyd, 2002). A taxa de prevalência nos países em desenvolvimento varia comumente de 20% a 30%. Relatos apontam o estabelecimento de áreas endêmicas, aonde a prevalência chega a 100%, devido a altos índices de transmissibilidade do protozoário. Nos países desenvolvidos a prevalência varia de 3% a 7% (Ratanapo et al, 2008; Jensen et

al,2009). Estes números fazem da giardíase a parasitose mais frequente em países desenvolvidos.

1.1. Gênero *Giardia*

1.1.1. Taxonomia

A primeira vez na qual o protozoário *G. lamblia* foi observado em amostras de fezes diarreicas ocorreu em 1681, por Antonie van Leeuwenhoek ao examinar ao microscópio suas próprias fezes.

Em 1859 Lambl descreveu detalhadamente o flagelado visto nas amostras de intestino de humanos e o associou ao gênero *Cercomonas*, espécie *Cercomonas intestinalis* (Lambl, 1859). Grassi (1879) sem ter conhecimento da descrição feita por Lambl descreveu uma espécie encontrada em roedor, *Dimorphus muris*, conhecida nos tempos atuais por *Giardia muris*. Kunstler (1882-1883) ao encontrar um organismo nas amostras intestinais de girinos o descreveu como *Giardia agilis*, sendo o gênero escolhido para homenagear o zoólogo francês Professor Alfred Mathieu Giard. Davaine (1889), ao observar amostras de fezes de coelhos, encontrou formas que se assemelhavam com as formas de *Giardia* descobertas por Filice, que caracterizou o ciclo de vida do parasita, entretanto nomeou seu achado de *Hexamita duodenalis*. A denominação *Lamblia intestinalis* sugerida por Blanchard em 1888 foi alterada por Stiles em 1902 para *Giardia duodenalis*. Anos mais tarde, Kofoid e Christiansen propuseram o nome *G. lamblia* (1915) e *G. enterica* (1920).

Por muitos anos houve contradição quanto ao número de espécies de *Giardia*, do mesmo modo, aumentaram-se as investigações com o objetivo de determinar a origem do hospedeiro e a morfologia das espécies. Ao utilizar os critérios morfológicos, Simon (1922) diferenciou a espécie *G. lamblia* de *G. muris*, demonstrando que apenas a primeira estava correlacionada com a forma humana. Assim sendo, Filice em 1952, ao investigar as características morfológicas do protozoário, sugeriu três espécies com base em sua morfologia, isto é, no tamanho do disco ventral adesivo em relação ao

comprimento da célula e o formato do trofozoíto – *G. agilis*, *G. muris* e *G. lamblia*. Porém, apenas em 1970 que o nome *G. lamblia* foi aceito e continua sendo utilizado até o momento, não havendo razões para abandoná-lo, embora no passado tenham ocorrido tentativas de pesquisadores para incentivar o uso do nome *G. duodenalis* (1980) e *G. intestinalis* (1990) (Filice, 1952, Kulda & Nohynkova, 1996).

Em suma, o gênero *Giardia* é membro do filo Sarcocystophora, da classe Zoomastigophora, da ordem Diplomonadida e da família Hexamitidae (Thompson et al, 1993). Atualmente compreende o gênero cerca de seis espécies nomeadas, *G. ardeae* e *G. psittaci* em pássaros, *G. muris* e *G. microti* em roedores, *G. agilis* em anfíbios e *G. lamblia* em mamíferos.

1.1.2. Caracterização Genética

A introdução das técnicas moleculares tem revolucionado de forma singular o estudo epidemiológico da giardíase por meio de análises baseadas na amplificação do ácido nucléico *in vitro*. Dados genéticos sugerem que *G. lamblia* possa ser um complexo de espécies atribuídas a oito linhagens (A-H), cujos membros possuem pouca variação na morfologia e na especificidade do hospedeiro dependente do genótipo (Monis et al, 2003).

Isolados de *G. lamblia* das linhagens (A e B) estão associados às infecções humanas em todo o mundo (Caccio & Ryan, 2008). Essas linhagens podem ser divididas em sub-linhagens segundo a variedade genética das mesmas. Assim, temos a linhagem A, sub-linhagens AI e AII (isoladas de humanos), AIII e AIV (isoladas de animais). Similarmente os isolados da linhagem B são divididos em sub-linhagens BI e BII (isoladas de cães e macacos), BIII e BIV (isoladas de humanos) (Thompson et al, 2000; Monis et al, 2003). Apesar dos isolados da linhagem (A) serem os mais investigados, dados epidemiológicos recentes têm registrado grande relevância dos isolados da linhagem (B). A prevalência da linhagem (B) vem atingindo 58%, enquanto que a prevalência da linhagem A atinge apenas 37%, ambos em giardíase humana (Una Ryan & Simone M Caccio, 2013).

As linhagens que diferem dos isolados A e B são encontradas em animais e rotuladas de C a H, logo os isolados C e D ocorrem em cães (por exemplo, em filhotes alojados em canil de criação), lobos, coiotes e gatos. Isolados do conjunto E são achados em bovinos (por exemplo, em ambientes como celeiro fechado), bubalinos, suínos e caprinos. Já os isolados do conjunto F, são identificados em gatos, enquanto os isolados do conjunto G têm sido encontrados em ratos (Monis et al, 2009; Caccio et al, 2008). Recentemente Lasek-Nesselquist e colaboradores (2010) divulgaram o conjunto H, identificado em focas (*Halichoerus grypus*) e gaivotas (*Larus argentatus*) sugerindo que o parasito (*G. lamblia*) tenha mais diversidade genética e de hospedeiro do que imaginavam anteriormente.

1.1.3. Diferenciação celular

A diferenciação celular na *Giardia* spp. requer dois processos de transição atribuídos às formas de trofozoíto e cisto.

1.1.3.1. Estrutura dos trofozoítos

Os trofozoítos de *G. lamblia* são formas multiplicativas não invasivas que aderem na mucosa do intestino delgado e são responsáveis por manifestações clínicas. Sua forma é bastante peculiar, sendo equiparada a uma pêra cortada no sentido do comprimento. Apresentam simetria bilateral e medem cerca de 12-15 micrômetros de comprimento, 5-9 micrômetros de largura e 1-2 micrômetros de espessura (Gillin et al, 1996).

Aspectos morfológicos comuns a outros eucariotos não são visualizados nos trofozoítos de *Giardia* spp, que carecem da presença de mitocôndria, de peroxissomos e do complexo de Golgi durante toda divisão celular. Por outro lado, os trofozoítos possuem um citoesqueleto complexo que determina o formato do parasito e âncora os quatro pares de flagelos presentes no corpo celular onde emergem ventralmente, anterior-lateralmente, posterior-lateralmente e caudalmente, oriundos do corpo mediano e do disco ventral. Os corpos basais são os sítios de onde geram os flagelos. Os flagelos são

fundamentais para sobrevivência do parasito no hospedeiro, uma vez que promovem a mobilidade dos trofozoítos e auxiliam no processo de ligação mecânica entre o trofozoíto e os enterócitos no intestino (Adam, 2001; Palm et al, 2005). Trofozoítos de *G.lamblia* possuem além das estruturas citadas, dois axonemas de flagelo e dois núcleos ovalados, diploides (2 x 2N) idênticos morfológicamente e geneticamente, rodeados por envelopes nucleares, com replicação simultânea, medidas de 1 μ m de diâmetro cada, localizados na metade anterior da célula, com divisão por bipartição (Solari et al, 2003). Os dois corpos medianos presentes em formato de vírgula, são componentes do citoesqueleto, equivalentes a uma estrutura desordenada de microtúbulos posterior aos dois núcleos. Durante o ciclo celular, a forma e a presença dos corpos medianos variam, ausentando-se na mitose antes da divisão do disco ventral. Possivelmente os corpos medianos comportam como um reservatório de subunidades de tubulina, logo a presença desses reservatórios permitem a rápida montagem de estruturas como o disco ventral, sendo assim, admite certa manutenção da infecção onde reduz a retirada dos trofozoítos que encontram em processo de divisão através dos movimentos peristálticos do intestino. (Elmendorf et al, 2003; Dawson et al, 2010).

No lado anterior ventral dos trofozoítos, a estrutura conhecida por disco ventral ou disco suctorial ou disco adesivo, também compõe o citoesqueleto, estando ligada à membrana plasmática por pequenas fibras compostas por α e β tubulina, proteínas contráteis e proteínas da família das giardinas (α - giardina, β - giardina, γ - giardina e δ - giardina). Um dos papéis do disco ventral está relacionado à sucção promovida para aderência dos trofozoítos no epitélio das microvilosidades intestinais (Solari et al, 2003; Benchimol, 2004).

Assim sendo, as organelas presentes no parasito como os flagelos e o disco ventral tornam-se fundamentais, uma vez que os trofozoítos não invadem o epitélio do hospedeiro, ficando dependentes da mobilidade e da forte adesão promovida por tais organelas na parede intestinal (Ankarklev et al, 2010).

1.1.3.2. Estrutura dos Cistos

Os cistos de *Giardia* spp. são responsáveis pela propagação da infecção em novos hospedeiros susceptíveis. Quando maduros, exibem formato ovoide, não se movimentam, medem aproximadamente de 8 a 12 µm de comprimento por 7 a 10 µm de largura. Os cistos são compostos por uma camada externa de 0.3 a 0.5 µm de espessura que é circundada por uma rede filamentosa de 7 a 20 nm de diâmetro (Adam, 2001). Ainda assim, contêm uma parede externa com componentes derivados do açúcar, principalmente galactosamina em forma de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) e proteínas originadas da parede do cisto (CWPs) (Karr et al, 2004). As principais CWPs identificadas são: CWP1, CWP2 e CWP3, as quais possuem repetições ricas em leucina e resíduos de cisteína conservados. Mais recentemente foi descrito a presença de proteína derivada do cisto em proteínas de superfície não variante (VSP) rica em cisteína (HCNCp) que tem a expressão aumentada no trofozoíto durante a encistação (Davids BJ et al, 2006).

A camada interna dos cistos apresentam duas membranas que atuam na proteção do parasito, delimitando o espaço periplasmático. Dependendo do estágio de maturação, o cisto pode ter de dois a quatro núcleos em seu citoplasma, fragmentos do disco adesivo e flagelos “desmontados”. O cisto é composto de 60% de carboidratos e 40% de proteínas. As fortes interações entre os carboidratos dos açúcares e as proteínas da parede do cisto (CWPs) fazem com que o mesmo resista à lise hipotônica, ao ácido gástrico e às inúmeras adversidades encontradas no ambiente externo, onde o metabolismo do cisto é desacelerado e o mantém dormente. (Lujan et al, 1997; Paget et al, 1998).

1.1.3.3. *Excistação e Encistação*

O processo que é definido como “excistação” é a liberação dos trofozoítos internos no cisto, e ocorre após a ingestão de cistos viáveis por um indivíduo. O cisto que mantinha-se dormente torna-se metabolicamente ativo e sofre excistação quando é exposto a alta concentração de hidrogênio (H^+) presente no estômago e finalizado durante a exposição aos conteúdos da porção proximal do intestinal delgado. Neste local ocorre a ruptura em um dos polos do

cisto, a qual é auxiliada por proteases pancreáticas e pelo pH levemente alcalino do duodeno. Os flagelos são os primeiros a aparecer quando emergem de um dos polos abertos no cisto, seguidos do corpo do excizoíto (Adam, 2001).

Excizoítos é o nome dado às formas ovais de trofozoítos encistados com quatro núcleos, os quais dividem-se rapidamente e subsequentemente sofrem divisão celular completa originando quatro trofozoítos binucleados (Bernander et al, 2001). Se a liberação dos trofozoítos nascentes acontecesse de maneira prematura em outras regiões como no estômago por conta do pH ácido e/ou no cólon do intestino delgado em função da baixa concentração de lipídeos e de outros nutrientes, ambas regiões destruiriam os trofozoítos nascentes e impediria o estabelecimento da infecção (Lujan, H. D et al, 2003)

Durante o processo de excistação não há tempo hábil para que ocorra a transcrição ou tradução de novas proteínas pela rápida passagem do cisto no estômago. Por outro lado, estruturas armazenadas em fragmentos e pré-montadas no cisto como o citoesqueleto e os discos ventral desmontado, são rapidamente reagrupados, fornando estruturas funcionais para o estabelecimento da infecção no novo hospedeiro. A atividade da proteína-quinase A e a sinalização de cálcio (Ca^{2+}), além da fosforilação e desfosforilação de proteínas chaves, vêm sendo citados por desempenharem papéis de importância no processo de excistação (Hetsko et al, 1998; Adam, 2001; Carranza & Lujan, 2010).

O encistamento ou encistação é o processo pelo qual o trofozoíto perde a motilidade e passa para o estado não móvel. Esse processo é desencadeado devido ao surgimento de um ambiente agressivo ao trofozoíto, isto é, ocorre aumento no nível da bile, redução do colesterol e surgimento de um pH mais alcalino. Necessariamente acontecem manifestações estruturais no trofozoíto, como, a incapacidade de aderência ao epitélio intestinal devido à fragmentação do disco ventral, a internalização dos flagelos e a formação de vesículas secretórias específicas para encistação (ESV). O parasito altera quanto ao formato inicial, passando para arredondado e entra em dormência

hipometabólica. Logo, o encistamento do parasito contribui para evasão do sistema imune por dois caminhos diferentes: o primeiro, a parede do cisto cobre a superfície do trofozoíto durante o encistamento de forma a isola-lo dos mecanismos imunes do hospedeiro. No segundo, o encistamento leva a alteração das proteínas de superfície variantes (VSPs) (R. Larocque et al, 2003; Ankarklev et al, 2010).

A carência de colesterol é o gatilho para desencadear a diferenciação dos trofozoítos em cistos. Os trofozoítos de *Giardia* não sintetizam colesterol, obtendo-o da porção duodenal do intestino delgado do hospedeiro. Portanto, durante a passagem dos trofozoítos nas porções finais do intestino delgado do hospedeiro, perante a privação de colesterol no micro-ambiente, inicia-se o processo de encistamento (Lujan H.D et al, 1997).

1.1.3.4. Ciclo Biológico

O protozoário *Giardia* tem duas formas evolutivas no ciclo biológico equivalente aos cistos relacionados à infecção e aos trofozoítos responsabilizados pela doença nomeada giardíase. É um protozoário monogenético, antroponótico e zoonótico que se reproduz através da divisão binária (Adam, 2001; Xiao & Fayer, 2008).

Os cistos são altamente contagiosos e este fato faz com que a ingestão de apenas 10 a 25 cistos, cause a doença. No meio ambiente, devido aos artifícios presentes na parede cística, a resistência a inúmeros fatores ambientais adversos pode ser estendida por até um ano. A ingestão ocorre por duas vias principais com rota fecal-oral, sendo assim, alimentos ou água contaminados com fezes de indivíduos infectados e o contato pessoa-pessoa representam os meios de infecção da giardíase (Andersen MD et al, 2007). Geralmente a infecção transmitida pessoa-pessoa ocorre em ambientes que há aglomeração de indivíduos positivos para *Giardia*, aliado a possíveis precariedades na higiene local, exemplificados por creches, asilos ou orfanatos (Thompson, 2000; Slifko et al, 2000; Feng & Xiao, 2011).

Os cistos quando ingeridos tornam-se metabolicamente ativos e a transição do cisto para trofozoíto acontece em 15 minutos aproximados, entretanto os mecanismos moleculares que regem esta rápida diferenciação são desconhecidos (Hetsko et al, 1998). No estômago do hospedeiro, os cistos sofrem certa sensibilização da parede cística quando a mesma entra em contato com o pH ácido do estômago (Gillin et al, 1996). Ao serem encaminhados para o intestino delgado, especificamente na região duodenal, ocorrem estímulos suficientes para induzir à liberação dos trofozoítos dado a presença de proteases pancreáticas como a tripsina e a quimiotripsina. Na luz intestinal, os trofozoítos penetram no muco e aderem nas células epiteliais, apesar de não invadir a mucosa. Sobrevivem mediante a absorção de nutrientes presentes, utilizando a glicose, aminoácidos e o colesterol do hospedeiro como fonte de energia (Adam, 2001; Oberhuber et al, 1997; Ankarklev et al, 2010).

Os trofozoítos ligados aos enterócitos estão envolvidos em uma camada de muco cercada por um pH neutro e pela baixa concentração da bile. Quando ocorre a renovação do epitélio, os enterócitos são descartados e os trofozoítos aderidos a ele são obrigados a soltarem e mover contra a corrente do lúmen para aderir em um novo enterócito. Eventualmente, se os trofozoítos permanecerem no lúmen serão expostos ao pH ligeiramente alcalino e ao aumento da concentração da bile. A partir disto, o microambiente se torna inadequado para sobrevivência dos mesmos e então se inicia o processo de encistamento (Lauwaet et al, 2007).

A resistência da parede do cisto permite ao parasito sobreviver dentro e fora do hospedeiro, ainda que sob condições ambientais hostis, garantindo a perpetuação da infecção para novos hospedeiros susceptíveis (Lujan et al, 1997).

1.1.4. Manifestações Fisiopatológicas e Clínicas

As manifestações clínicas da *G. lamblia* são extremamente variáveis entre os indivíduos infectados. A doença costuma ser assintomática em muitos casos. As infecções agudas e crônicas são atribuídas aos casos sintomáticos (Solomons, 1982). Os pacientes sintomáticos da giardíase são representados por uma pequena parcela das amostras positivas, expondo os sintomas em 6-15 dias após a infecção com durabilidade de 2-4 dias na fase aguda ou semanas na fase crônica. Dentre as características clínicas da infecção, as que se destacam são: dor abdominal, náusea, vômito, perda de peso (Eckmann, 2003), inchaço, diarreia com ou sem a síndrome de má absorção, desidratação, má digestão, flatulência, esteatorréia, urticária e sensibilidade contra os antígenos alimentares (Di Prisco et al, 1998). As crianças sofrem consequências mais graves, estando sujeitas ao retardamento no desenvolvimento físico e cognitivo, além dos efeitos prejudiciais no estado nutricional (Berkman et al, 2002).

A fisiopatologia da giardíase ocorre sem que haja invasão dos trofozoítos no epitélio intestinal. Apesar das consequências da infecção ser multifatoriais e envolverem fatores ligados ao parasito e dependente do hospedeiro como, processos imunológicos e não imunológicos da mucosa. Observações recentes sugerem que a gravidade da doença pode ser variável diante a áreas industrializadas e em desenvolvimento do mundo (Robertson et al, 2010; Haque et al, 2009). Igualmente, a fisiopatologia da giardíase pode ocasionar distúrbios gastrointestinais crônicos exemplificados pela Síndrome do Intestino Irritado (IBS), aliados ou não a patologias extra-intestinais ainda que os parasitos permaneçam no interior do trato gastrointestinal (Dizdar et al, 2007; Cotton et al, 2011).

Paralelamente à adesão dos trofozoítos nas células epiteliais, ocorre uma série de eventos os quais se interligam na produção da diarreia, assim, incluímos a alta taxa de apoptose dos enterócitos, a disfunção da barreira intestinal, o encurtamento da borda em escova das microvilosidades, acompanhados ou

não da atrofia das vilosidades, as deficiências de dissacaridases, a ativação de linfócitos do hospedeiro, a hipersecreção de ânion e o aumento do trânsito intestinal, exemplificam os estágios da disfunção intestinal (Buret et al, 1991; Wolfe, 1992; Cotton et al, 2011).

A apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico que desempenha o papel de controlar o número de células ideais para o organismo o qual mantém o crescimento celular e a morte equilibrados (Earnshaw, 1995).

Uma variedade de enteropatógenos são conhecidos por destruir a barreira intestinal em função da apoptose induzida dos enterócitos (O'Hara & Buret, 2008). Na giardíase crônica ocorre perda de função da barreira epitelial; este fator está diretamente associado ao aumento da ativação dos genes que levam às cascatas de apoptoses dos enterócitos, estando dependente de caspase-3 e de caspase-9 (Chin et al, 2002). A ativação de ambas caspases induz ao aumento da expressão da proteína Bax pré-apoptose e diminui a expressão da proteína Bcl-2 anti-apoptose, ou seja, a disfunção da barreira epitelial em pacientes com giardíase crônica está também associada ao aumento das taxas de apoptose dos enterócitos. Esse fenômeno ocorre, em parte, porque os trofozoítos de *Giardia* consomem a arginina local e inibem os enterócitos de produzirem óxido nítrico, (NO), uma substância imunomoduladora cuja ação antiinflamatória inibe a produção de citocinas inflamatórias ou impede a produção dos mediadores inflamatórios locais, que retardariam o desenvolvimento dos trofozoítos (Roxström-Lindquist et al, 2006; Panaro et al, 2007).

Recentes observações da giardíase têm demonstrado que a permeabilidade intestinal e a absorção de macromoléculas quais são alteradas quando coincidem com o pico de trofozoítos colonizados no intestino delgado. O aumento da permeabilidade intestinal mediado pelo parasito é resultado das alterações ocorrentes nos complexos juncionais apicais, que inclui interrupções de F-actina, ZO-1, claudina-1 e α -actina, um dos componentes do anel de actomiosina que regula o fluxo paracelular (Scott et al, 2002; Troeger et al, 2007; Maia-Brigagão et al, 2012). Durante a infecção pode ocorrer a redução

da área total de absorção, seguida ou não da atrofia das vilosidades, o que representa um fator importante para diarreia via má-absorção de vitamina B₁₂, ferro, sódio, zinco, vitaminas lipossolúveis e má-digestão (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011; Saki et al, 2011).

De acordo com Troger e colaboradores (2007) pacientes com giardíase crônica são caracterizados por apresentam redução na área da superfície duodenal e este processo, assim como a deficiência de dissacaridases microvilares são mediados por linfócitos CD8⁺ ativados, corroborando com a hipótese de que a imunopatologia mediada pela *G. lamblia* ocorre secundariamente ao rompimento da barreira intestinal, aliados ou não à presença de toxinas vindas do parasito (Scott et al, 2004).

A giardíase tende a ser auto-limitante em indivíduos imunocompetentes, entretanto, em crianças, a infecção aguda pode ocasionar anorexia, falhas no crescimento físico e cognitivo e no estado nutricional. Em caso de re-infecção, os sintomas tendem a ser mais brandos quando parte do pressuposto que, uma exposição prévia, apesar de não proteger de futuras infecções, reduzirá a severidade da doença (Kohli et al, 2008).

1.1.5. Epidemiologia da Giardíase

A prevalência da giardíase no Brasil varia de acordo com a localidade, a metodologia empregada no estudo e as populações estudadas, logo, a faixa etária mais atingida é de pré-escolares e lactentes, estabelecendo-se nessa população um sério problema de saúde pública. Em várias regiões do Brasil, estudos sobre a prevalência da giardíase em crianças nos últimos dez anos, demonstraram uma redução significativa, entretanto, a prevalência desta parasitose permanece elevada, variando de 21,5% no norte, 9,3% a 13,5% no nordeste, 9,9% no centro-oeste, 4,7% a 27,5% no sudeste e 14% a 24% no sul (Carvalho-costa et al, 2007; Pereira et al, 2007; Basso et al, 2008; Machado et al, 2008; Korkes et al, 2009; Menezes et al, 2009; Tashima et al, 2009; Moreno et al, 2010; Santos et al, 2012; Gil et al, 2013).

Nos países industrializados, a *G. lamblia* é um dos parasitos mais frequentemente identificados, alcançando taxas de prevalência entre 2-7%, sendo o causador mais usual de surtos epidêmicos de diarreia, relatados nos Estados Unidos (Hörman et al, 2004, CDC 2010; Baldursson & Karansis, 2011).

Bussatti e colaboradores (2009) relataram que na América Latina, Ásia e África, anualmente ocorre 500 milhões de novos casos de giardíase a cada ano, aonde cerca de 200 milhões de pessoas apresentam a doença sintomática. Conseqüentemente, a giardíase deve ser observada com especial cuidado, pois contribui de forma substancial para geração de adultos com déficit no desenvolvimento cognitivo e físico.

1.1.6. Tratamento

Os nitroimidazóis constituem os principais fármacos para o tratamento da giardíase, particularmente o metronidazol, e ainda mais recente o nitazoxanida e o tinidazol (Freeman et al, 1997; Gardner et al, 2001).

O tratamento padrão utilizando o metronidazol requer alta dosagem (250 mg – três vezes ao dia) do fármaco e tempo prolongado de tratamento (3 a 5 dias). Os efeitos colaterais indesejáveis atribuídos ao tratamento são: náusea, vômito, diarreia, paladar metálico, boca seca, (Mohammadi et al, 2010), cefaleia, insônia, vertigem, sonolência, (Stanley, 2003; Haque et al, 2003), pancreatite aguda (O'Halloran et al, 2010) e encefalopatia (Hoom et al, 2011).

A falha no tratamento pode ocorrer em 20% dos casos de giardíase apesar da eficácia dos nitromidazóis e com isto pode ocasionar beneficiamento indireto para o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos (Upcroft et al, 2001; Tejman-Yarden et al, 2011). A resistência clínica de *G. lamblia* ao metronidazol é comprovada, assim como ocorre à resistência cruzada com fármaco mais recente, o tinidazol (Wright JM et al, 2003).

Com base nas inúmeras adversidades que medicamentos químicos podem causar, o uso de probióticos como terapêutica em diversas doenças vem sendo estudado, assim como na giardíase.

1.2. Probióticos

1.2.1. Definição

A comunidade microbiana do trato intestinal possui aproximadamente cem trilhões de bactérias, é uma comunidade relativamente populosa, a qual co-evoluiu com a mucosa intestinal de modo a ser essencial para a homeostase do intestino. No entanto, o desequilíbrio da microbiota intestinal - disbiose - igualmente está relacionado às doenças que não se limitam ao trato gastrointestinal, como por exemplo, a desnutrição, que pode promover mudanças na composição da microbiota intestinal (Hooper et al, 2010; Qin et al, 2010; Smith et al, 2013).

Probiótico é um termo utilizado para bactérias que estão associadas a efeitos benéficos para homens e animais. O termo “probiótico” é relativamente novo e seu conceito é oposto ao conceito de “antibiótico” (Corcionivoschi et al, 2010), no entanto este último ainda é utilizado como primeira escolha no tratamento de diversas doenças infecciosas.

No início do século XX o cientista russo Elie Metchnikoff introduziu um estudo que concedeu a ele o prêmio Nobel por demonstrar que *Lactobacillus bulgaricus* foi capaz de eliminar os efeitos nefastos de bactérias patogênicas da microbiota, intestinal e, fundamentado nisto, concluiu: “a dependência entre microrganismos intestinais e a comida faz com que seja possível a adoção de medidas as quais modificam a flora do nosso corpo substituindo os microrganismos nocivos pelos úteis” (Metchnikoff, 1907).

Somente em 1965 que a palavra de origem grega “Probiótico” – “Para Vida” foi utilizada pela primeira vez por Lilly & Stillwell, os quais caracterizaram os

probióticos como “microrganismos que promovem o crescimento de outros microrganismos” (Lilly et al. 1965). Paker (1974), ao falar sobre um alimento suplementar para gado definiu probióticos como “organismos e substâncias que auxiliam no ecossistema microbiano”. Em 1989, Fuller definiu probióticos como: “microrganismos vivos com efeitos benéficos para o hospedeiro na melhora do equilíbrio intestinal” (Corcionivoschi et al. 2010).

A definição proposta pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) / Organização Mundial de Saúde (WHO) é “microrganismos vivos, que ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios á saúde do consumidor” (FAO/WHO, 2002). Pesquisas realizadas com microrganismos probióticos vêm sugerindo o uso dos mesmos no tratamento e na prevenção de infecções e nos distúrbios do trato gastrointestinal (Osvath, 2000). Além disso, determinadas linhagens promovem mecanismos de defesa no hospedeiro, sobretudo no trato intestinal caracterizados por estabilizar a microbiota local por meio de estímulos que desencadeiam respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias.

Os probióticos possuem aplicações voltadas a redução da colonização de patógenos (pela competição por espaço ou nutrientes) (Louis et al, 2010), melhoria na síntese de vitaminas, estimulação da proliferação e diferenciação de células epiteliais (Duerr et al, 2012), fortificação da barreira intestinal e otimização do trânsito intestinal (Corcionivoschi et al, 2010; Hooper et al, 2012). Nesse sentido, os probióticos, sejam isolados ou em combinações de diferentes microrganismos, garantem o bem estar do hospedeiro (Thomas & Versalovic, 2010; Vandenplas et al, 2014).

A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias ácido-láticas, gram-positivas, geralmente catalase-negativas, que crescem em microaerofilia. Dessa forma, os probióticos incluem espécies ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*; espécies não ácido-láticas, tais como, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*; e contamos ainda com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e

Saccharomyces boulardii (Holzapfel et al, 2001; Ozen et al, 2012). Geralmente bactérias ácido-láticas produzem uma diversidade de substâncias essenciais para a saúde do consumidor e prejudiciais para patógenos, como ácido lático, bacteriocinas e peróxidos (Shin et al, 2008).

1.2.2. Mecanismos de ação dos probióticos

O declínio do potencial patogênico de um microrganismo na presença de probióticos se dá através de vários mecanismos de ação do probiótico, a saber: 1) determinadas linhagens probióticas possuem capacidade de eliminar ou inibir por antagonismo a presença de patógenos (Lebeer et al, 2008; Bansal & Garg, 2008); 2) probióticos aprimoram a função da barreira epitelial por meio da modulação de várias vias envolvidas na indução da produção de mucinas e defensinas (células de Paneth e células de Globet) (Schlee et al, 2008) e também na prevenção da apoptose de enterócitos (Boirivant & Strober, 2007); 3) probióticos atuam na modulação da resposta imunológica do hospedeiro em nível sistêmico e local (Isolauri et al, 2001), através da proliferação de células T regulatórias, ativação de macrófagos, aumento na produção de imunoglobulinas (IgA e IgM) e citocinas e ativação de células dendríticas locais, que são capacitadas para apresentação de antígenos (Cross, 2002) (Figura 1).

Leblanc et al, (2008) ao avaliar em roedores a influência do consumo diário a longo prazo de leite comercial fermentado contendo bactérias probióticas sobre o sistema imune da mucosa intestinal, evidenciou que a administração oral contínua aumentou os níveis de células produtoras de IgA na lâmina própria tanto do intestino delgado como grosso. Demonstraram também o aumento de citocinas regulatórias como IL-10, e aumento de células produtoras de TNF- α , IFN- γ e IL-2. Assim o consumo de leite fermentado contendo bactérias probióticas em longo prazo aprimorou a imunidade da mucosa intestinal mediada por células IgA e pela produção de citocinas. A melhoria da mucosa

intestinal foi mantida e regulada para baixo por citocinas como IL-10, impedindo uma resposta imune inflamatória no intestino.

Palomar et al, (2014) avaliando o efeito de uma bactéria probiótica sobre o sistema imune de roedores que foram expostos ao stress induzido pela ingestão de alimentos e de restrição de mobilidade, constatou que após a administração do probiótico aumentou-se os níveis de células produtoras de IgA, células CD4⁺ na lâmina própria do intestino delgado e níveis séricos de IgA. Além disso, houve redução dos níveis de IFN- γ , aumentados durante o stress, e melhoria da microbiota intestinal, medida pelo aumento do número da população de *Lactobacillus casei*, demonstrando que o mesmo pode reparar os danos imunológicos causados pelo stress.

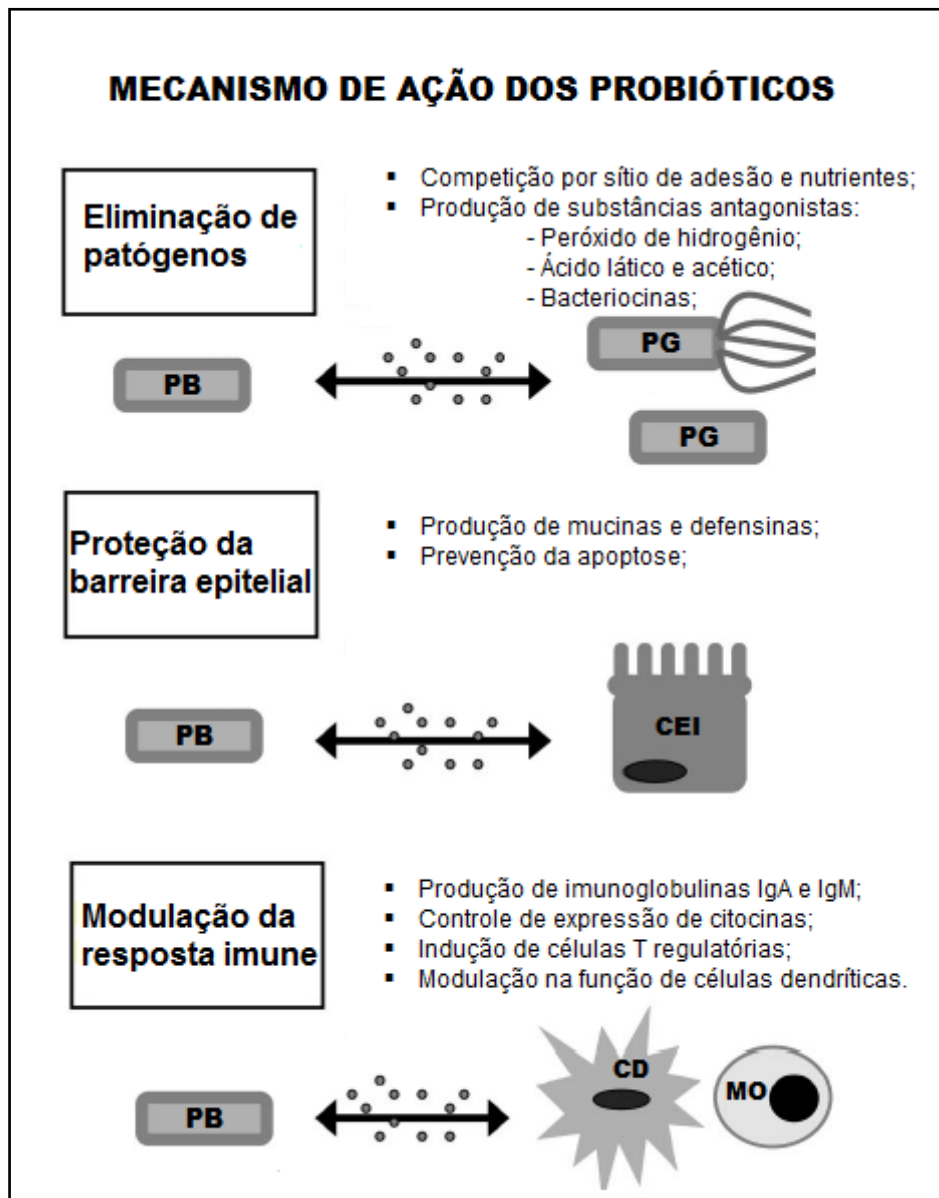


Figura 1: Resumo dos principais mecanismos de ação dos probióticos. PB: probiótico; PG: patógeno; CEI: célula epitelial intestinal; CD célula dendrítica; MO: macrófago (Fonte: Adaptada de Lebeer, Vanderleyden e De Keersmaecker, 2008).

1.2.3. Gênero *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* é formado por mais de 31 espécies, algumas foram isoladas da mucosa oral e vaginal, entretanto a vasta maioria está presente na microbiota intestinal (Lee & O'sullivan, 2010). Bactérias desse gênero representam de 3-6% da microbiota fecal de um adulto (Schell et al, 2002). A espécie *Bifidobacterium longum* vem sendo amplamente utilizada na produção

de alimentos industrializados, com a alegação de contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal (Botelho, 2005).

Tissier e colaboradores (1906) foram os primeiros a promover o uso terapêutico de bactérias bífidas no auxílio de tratamento de distúrbios intestinais, pois acreditavam que estas desalojavam bactérias putrefativas, que são responsáveis por problemas intestinais e indisposições gástricas, enquanto restabeleciam-se como organismos predominantes no intestino (Hughes & Hoover, 1991). Depois disto, vários estudos demonstraram múltiplas utilidades de *B. longum*, como a redução da produção de citocinas inflamatórias e da resposta imune mediada por células T CD4+ em modelo animal de enteropatia induzida por gliadina (Laparra et al, 2012). Outros estudos mostraram efeito protetor contra o vírus Influenza em modelo experimental (Llwabuchi et al, 2011) e redução dos sintomas em paciente com intolerância a lactose (He et al, 2008).

A linhagem *B. longum* 5^{1A}, isolada no laboratório de ecologia e fisiologia de microrganismos (UFMG) possui diversas propriedades benéficas comprovadas in vitro, em modelos animais de infecção e inflamação e em humanos, o que permite descrevê-la como candidata ao uso em formulações probióticas

1.2.4. Gênero *Weissella*

Collins e colaboradores (1993) investigaram a proximidade filogenética entre alguns isolados de bactérias de salsicha grega com outras bactérias ácido lácticas, demonstrando que as mesmas não poderiam ser agrupadas no gênero *Leuconostoc* por apresentarem características próprias. Embora estes microrganismos produzissem ácido láctico D (-), semelhante ao produzido por *Leuconostoc* spp, eles diferiam de muitas espécies vinculadas ao gênero em alguns testes bioquímicos e aspectos fisiológicos.

Com o propósito de esclarecer os resultados obtidos em meio aos testes, os pesquisadores realizaram o sequenciamento do gene 16S de rRNA dessas bactérias e também a análise dos valores correspondentes às distâncias

evolucionárias entre as espécies do gênero *Leuconostoc* e algumas linhagens de *Lactobacillus* com os microrganismos isolados de salsichas gregas; chegaram a conclusão que existe forte relação filogenética das bactérias isoladas com o grupo *Leuconostoc paramesenteroides*. Deste modo, as espécies descobertas e as espécies relacionadas ao grupo *Leuconostoc paramesenteroides* foram incluídas no novo gênero denominado *Weissella* e as bactérias isoladas das salsichas gregas foram classificadas como uma nova espécie, denominada *Weissella hellenica* (Viegas, 2008).

O gênero *Weissella* compõe um grupo de microrganismos gram-positivo, heterofermentadores obrigatórios, com formato de cocos ou bastonetes, não esporulantes e sem motilidade. Pertence a família Leuconostocaceae, ordem Lactobacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes. Estão neste gênero espécies como *Weissella confusa* (anteriormente *Lactobacillus confusus*), *W. minor* (anteriormente *Lactobacillus minor*), *W. kandleri* (anteriormente *Lactobacillus kandleri*), *W. halotolerans* (anteriormente *Lactobacillus halotolerans*), *W. viridescens* (anteriormente *Lactobacillus viridescens*), *W. paramesenteroides* (anteriormente *Leuconostoc paramesenteroides*) e *W. hellenica* segundo a reclassificação de Collins e colaboradores (1993). Algumas espécies do gênero *Weissella* já foram estudadas tendo apresentado efeitos benéficos para a saúde humana (Choi et al, 2012; Moon et al, 2012).

1.3. Modelo experimental para giardíase

Nos últimos anos ampliou-se a utilização de *Meriones unguiculatus* (Gerbils) como modelo experimental de uma variedade de parasitos vinculados aos homens e animais, por exemplo, *Brugia pahangi*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondi*, *Strongyloides stercoralis*, *Giardia lamblia*, dentre outros. Especialmente para giardíase, os Gerbils vêm sendo escolhidos, devido à suscetibilidade para a infecção por via oral de cistos ou trofozoítos e também pela possibilidade de averiguar as alterações fisiopatológicas existentes nestes animais que se assemelham às de humanos. Em vista disto, muitos autores acreditam que *Meriones unguiculatus* permita a obtenção de bons resultados

relacionados ao comportamento da infecção e às novas abordagens estratégicas para intervenção da mesma (Mohanty et al, 2002; Chirgwin et al, 2003; Humem et al, 2005; Araújo et al, 2008).

Considerando o exposto, este trabalho avaliou a influência do consumo de *Bifidobacterium longum* e *Weissella paramesenteroides* nas infecções por *G. lamblia* em modelo experimental, avaliando alguns aspectos da mucosa intestinal do animal submetido à infecção e ao tratamento com o probiótico. Pretende-se com isso aprimorar a exploração e compreensão dos mecanismos moleculares que regem a infecção por *G lamblia* e a ação de *Bifidobacterium longum* e *Weissella paramesenteroides* na giardíase.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário *Giardia lamblia* é um dos parasitos mais comuns em humanos e animais domésticos em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A variedade de sintomas é uma das características mais expressivas na giardíase, dispendo de casos com infecção auto-limitante a casos graves de diarreia, os quais podem culminar em perda de peso em crianças infectadas, aliadas ou não às perdas nutricionais e déficit de crescimento e/ou cognitivo nos casos mais extremos. O parasita apresenta caráter de propagação antroponótico e zoonótico, e estando associado à grande resistência ao meio externo e ao tratamento farmacológico, eleva a prevalência da giardíase principalmente em áreas onde o crescimento populacional desordenado não é acompanhado por melhorias nas condições de infraestrutura, sobretudo relacionadas ao tratamento de água e esgoto.

As peculiaridades acima ressaltadas sinalizam a importância da pesquisa de novas alternativas terapêuticas que apresentem como minimizadoras da resistência medicamentosa, portando-se como ferramenta atrativa no combate da giardíase. Nessas circunstâncias, linhagens probióticas bem caracterizadas para a sobrevivência *in vivo* e com propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras comprovadas podem constituir-se como ferramentas de redução da infecção.

Bifidobacterium longum 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 são duas linhagens bacterianas que vem sendo estudadas pelos departamentos de Microbiologia e Biologia geral deste Instituto, que são candidatas ao uso como probióticos para humanos e animais, respectivamente, uma vez que apresentam diversas propriedades benéficas previamente demonstradas.

Considerando o exposto, este trabalho pretende avaliar a influência do consumo de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 nas infecções por *G. lamblia* em modelo experimental, avaliando alguns aspectos da mucosa intestinal do animal durante a infecção e o tratamento com o probiótico. Pretende-se com isso aprimorar a exploração e compreensão dos

mecanismos moleculares que regem a infecção por *G lamblia* e a ação de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 na giardíase.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar o efeito da administração oral de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 sobre a infecção por *Giardia lamblia* em gerbils (*Meriones unguiculatus*).

3.2 Específicos

- Realizar análise histopatológica do intestino delgado de animais tratados ou não com *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 e submetidos ao desafio com *G. lamblia*.
- Realizar análise qualitativa e quantitativa da secreção de muco no intestino delgado de animais tratados ou não com *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 e submetidos ao desafio com *G. lamblia*.
- Realizar análise qualitativa e quantitativa do parasitismo na mucosa intestinal de animais tratados ou não com *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 e submetidos ao desafio com *G. lamblia*.

Materiais e Métodos

4. MATERIAL E METÓDOS

4.1. *Modelo Experimental*

Foram utilizados nos experimentos 60 gerbils (*Meriones unguiculatus*), com idade entre quatro e seis semanas, de ambos os sexos. Os animais foram obtidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estes foram mantidos no Biotério do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais (LAPI), durante o período experimental de 17 dias, em gaiolas coletivas com controle de temperatura e fotoperíodos de 12h, com livre acesso à água filtrada e dieta.

Antes do início do experimento, os animais foram tratados com Ivermectina 1% solução injetável, para assegurar que os mesmos estavam livres de qualquer parasitose. Cada animal recebeu 0,1mL (10µg) da droga por via subcutânea.

4.2. *Divisão de Grupos e Delineamento Experimental*

Previamente ao início do experimento, os animais foram aclimatados durante cinco dias, receberam ração comercial e água filtrada *ad libitum*. Após este período, foram distribuídos em seis grupos de 10 animais cada: grupo *Bifidobacterium longum* com *Giardia* (grupo BLi); grupo *Bifidobacterium longum* sem *Giardia* (grupo BLc); grupo *Weissella paramesenteroides* com *Giardia* (grupo WPi); grupo *Weissella paramesenteroides* sem *Giardia* (grupo WPC); grupo controle infecção com *Giardia* (grupo Ci); grupo controle sem *Giardia* (grupo Cc).

Após 10 dias de tratamento diário com os probióticos *Bifidobacterium longum* e *Weissella paramesenteroides*, os animais dos grupos BLi, WPi e Ci, foram infectados com *Giardia lamblia* e eutanasiados no décimo sétimo dia após o início do experimento.

4.3 Micro-organismos

Weissella paramesenteroides WpK4 foi isolada no laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), ICB-UFMG e identificada por Alvim (2011) a partir de amostras dos swabs nasais de suínos (*Sus domesticus*). A bactéria foi cultivada em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, USA) e incubada à 37°C durante 24 a 48 horas. Uma colônia deste isolado foi repicada e crescida em 10 mL de caldo MRS, incubada à 37°C durante 24 horas, sendo utilizada em seguida. Uma alíquota de 0,2 mL da cultura bacteriana adicionada de glicerol esterilizado (30%) foi utilizada para estocagem e manutenção em refrigerador a -80 °C. As alíquotas estocadas a -80 °C foram reativadas por meio de duas passagens em caldo MRS a partir de um inóculo de 2% (v/v). Para cada passagem, os isolados foram mantidos em estufa por 18 horas a 37°C para o crescimento (Alvim, 2011).

Bifidobacterium longum 5^{1A}, de origem humana, pertencente ao laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, foi cultivada em caldo MRS em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Marietta, EUA) mantida em atmosfera de 85% N₂, 10% H₂, e 5% CO₂, à 37°C, sem agitação por 48 horas (Souza et al., 2013).

Trofozoítos da cepa GS/M-clone H7 (ATCC 50581) de *Giardia lamblia*, cultivados axenicamente no LAPI/UFMG em meio TYI-S-33 (DIAMOND, 1978), modificado por Keister (1983) e suplementado com bile bovina foram usados. A cultura foi mantida pela realização de repiques a cada 72/96 horas, e os tubos mantidos na posição de 30° em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C.

4.4. Administração de *B. longum* 5^{1A}, *W. paramesenteroides* WpK4 e *G. lamblia* aos respectivos grupos experimentais

Os animais receberam um inóculo diário de 10⁸ UFC de *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4, ressuspendidos em 100 µL de salina a 0,9%, por

gavagem, durante dez dias antes do desafio com trofozoítos de *Giardia lamblia*, que também foram administrados via gavagem, com o auxílio de uma cânula DELVO nº 15, acoplada a uma seringa de insulina, na quantidade de 0,1mL.

Após o desafio com trofozoítos de *G. lamblia*, os animais dos grupos experimentais (BLi e WPi) continuaram a receber inóculos diários dos isolados bacterianos e os grupos controles (Cc e Ci) continuaram a receber salina 0,9% por mais sete dias, quando foram sacrificados, 17 dias após o início dos tratamentos experimentais.

4.5. Ajuste do inóculo de *G. lamblia* para infecção experimental

No décimo dia do experimento, os animais foram desafiados com *G. lamblia*, exceto os controles dos probióticos. Tubos de cultura contendo trofozoítos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos para que ocorresse o desprendimento dos parasitos da parede dos mesmos. Após este período, 25µL da suspensão de parasitos foram adicionados a um microtubo contendo 75µL de corante vital (eosina 0,125%). Após homogeneização, a suspensão foi colocada na câmara de Neubauer para contagem das células. A suspensão utilizada para o inóculo dos animais apresentou concentração final de $5,0 \times 10^5$ trofozoítos/mL. Este inóculo foi escolhido por ter se mostrado capaz de infectar 100% dos animais pelos sete dias da experimentação.

4.6. Necropsia dos animais e coleta de materiais

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo uma solução de Ketamina (100 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg). Realizamos a abertura da cavidade peritoneal com incisão mediana, para a localização das vísceras.

O intestino delgado foi inteiramente coletado (~18 cm) e dividido em três porções iguais, sendo que os primeiros quatro centímetros da parte proximal foram destinados para processamento dos cortes histológicos. Toda porção

restante do intestino delgado, foi destinada à contagem de trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal.

Após a eutanásia, as carcaças foram imediatamente acondicionadas em sacos de lixo branco, identificados como lixo biológico infectante e refrigerados a -20°C no freezer do Departamento de Parasitologia, que é exclusivamente utilizado para o armazenamento temporário destas carcaças. Posteriormente, estas estruturas foram coletadas como lixo biológico infectante pelo serviço de limpeza do ICB, direcionados para o abrigo externo específico e recolhidos pelo Serviço de Limpeza Urbana (SLU).

4.7. Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal

Durante a necropsia foi coletada uma porção proximal do intestino delgado (extensão de 4 cm) que foi aberta longitudinalmente, colocada sobre uma superfície plana e enrolado em uma espiral com a luz intestinal voltada para dentro, de modo a formar rolos (rocamboles) com a porção duodenal. Os fragmentos enrolados em forma de rocamboles e amarrados com linha de costura foram fixados por imersão em solução Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos. Em seguida os rolos amarrados foram fixados por imersão em formol tamponado a 10% pH 7,2 por 24 horas. Após o período de fixação, todos os rocamboles coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina, para obtenção de cortes com 4µm de espessura. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foram feitas reações imunohistoquímicas para identificação de trofozoítos de *G. lamblia*.

4.7.1. Análise quantitativa do comprimento de vilosidades e área de muco

Todos os cortes histológicos corados com H&E foram visualizados pela objetiva de 10X do microscópio Axiolab (*Carl Zeiss, Germany*) para a digitalização aleatória de 30 vilosidades intestinais por meio da microcâmera JVC TK-1270/RGB (*Tokyo, Japan*). A altura das vilosidades e a altura das criptas foram calculadas através do *software* KS300 contido no analisador de imagens Carl

Zeiss. A base das vilosidades e a base das criptas foram delimitadas manualmente através de ferramentas do software, todos os pixels com tons de violeta, vermelho e bonina foram selecionados para criação de uma imagem binária e a altura das vilosidades e das criptas foram calculadas automaticamente.

Para o cálculo da área ocupada por muco nas vilosidades intestinais foi utilizados os cortes histológicos corados com PAS. As lâminas foram visualizadas pela objetiva de 40X do microscópio Axiolab para a digitalização aleatória de 30 imagens intestinais por meio da mesma microcâmara descrita previamente. Em cada animal foram analisados $1,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ de mucosa duodenal para o cálculo das áreas de muco que se mostravam PAS positiva. Todos os pixels com tons de bonina das regiões PAS positivo foram selecionados para a criação de uma imagem binária e para a obtenção da área de muco em μm^2 , conforme descrito por Oliveira et, al (2012).

A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens, processamento digital e definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliarì (1997).

4.7.2. Reação imunohistoquímica e análise quantitativa para trofozoítos

Os cortes para processamento em imunohistoquímica foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H_2O_2 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 com IgG biotinizada diluída a 1:50 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San

Francisco, USA) a 1:100. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%.

Como controles positivos foram usados cortes histológicos obtidos de lesões ricas em *Giardia*. Como controle negativo, o antisoro 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, toda a superfície mucosa foi visualizada através da objetiva de 10X e digitalizada por meio da mesma microcâmara. Todos os pixels com tons de marrom dos trofozoítos marcados pela imunohistoquímica foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área total de marcação. Processamento digital e recursos do software KS300 foram utilizados para eliminar artefatos.

4.8. Análise estatística

Os dados foram produzidos com o software GraphPad Prism® 4 (GraphPad Software Inc.). Os valores obtidos foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com a finalidade de verificar a normalidade das distribuições. Todas as análises estudadas apresentaram distribuição normal, de modo que as variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste *t-Student* e submetidas às análises de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Em todos os testes foram considerados como diferenças estatísticas os valores com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$), sendo obtidas as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos experimentais foram identificadas nos gráficos com letras diferentes, localizadas acima da barra de desvio-padrão. Ausências de letras sobre as barras ou presença de letras iguais sinalizou inexistência de diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Resultados

5. RESULTADOS

Todas as análises realizadas apresentaram distribuição normal, de modo que as variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste *t- Student* ou o teste de ANOVA paramétrico de um fator (One-Way – ANOVA), finalizado com o teste de Tukey.

5.1. Análise quantitativa da altura das criptas duodenais

A altura das criptas intestinais foi significativamente maior nos animais do grupo Ci ($66,78 \pm 6,867 \mu\text{m}$) quando comparado aos animais dos grupos Cc ($39,05 \pm 1,930 \mu\text{m}$), BLc ($41,35 \pm 1,436 \mu\text{m}$) e WPc ($51,17 \pm 2,365 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$). Os animais do grupo BLi ($78,45 \pm 3,856 \mu\text{m}$) e do grupo WPi ($75,48 \pm 2,785 \mu\text{m}$) apresentaram aumento significativo da altura das criptas em relação aos animais dos grupos Cc ($39,05 \pm 1,930 \mu\text{m}$), BLc ($41,35 \pm 1,436 \mu\text{m}$) e WPc ($51,17 \pm 2,365 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$).

Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos Ci ($66,78 \pm 6,867 \mu\text{m}$), BLi ($78,45 \pm 3,856 \mu\text{m}$) e WPi ($75,48 \pm 2,785 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$) (Figura 2).

A altura das criptas intestinais aumentou quando houve infecção, tanto em animais tratados previamente com *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4, como nos animais não tratados. O tratamento com os probióticos não alterou a altura das criptas intestinais.

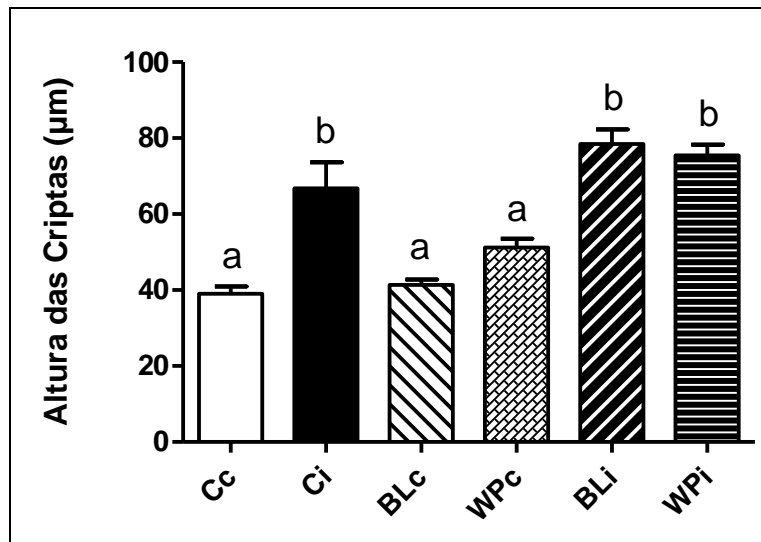


Figura 2: Altura das criptas intestinais (duodeno) (µm) dos grupos experimentais.

Cc: Gerbils sem infecção.

Ci: Gerbils infectados com *Giardia lamblia*.

BLc: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* sem infecção.

Wpc: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* sem infecção.

BLi: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* e infectados com *Giardia lamblia*.

Wpi: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* e infectados com *Giardia lamblia*.

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, $p < 0,05$.

5.2. Análise quantitativa da altura das vilosidades intestinais

Não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na altura das vilosidades intestinais entre os grupos avaliados (Figura 3). O tratamento com os probióticos e a infecção por *G. lamblia* não alterou a altura das vilosidades intestinais.

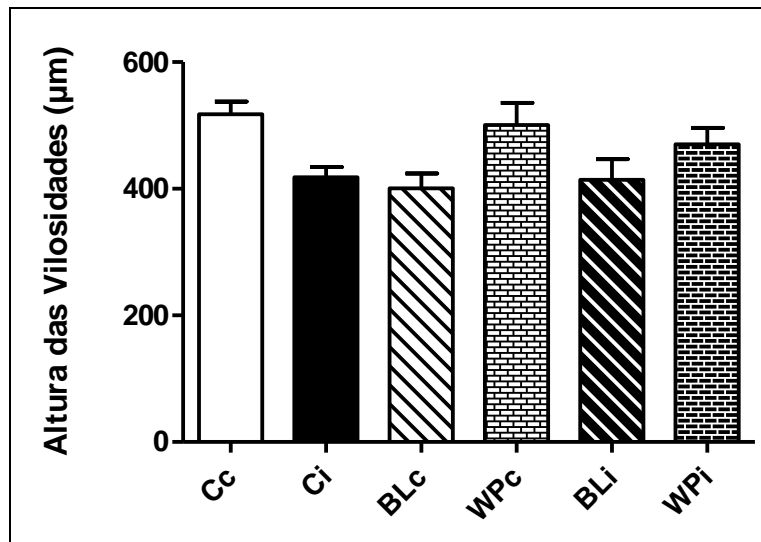


Figura 3: Altura das vilosidades intestinais (duodeno) (µm) dos grupos experimentais.

Cc: Gerbils sem infecção.

Ci: Gerbils infectados com *Giardia lamblia*.

BLC: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* sem infecção.

WPC: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* sem infecção.

BLi: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* e infectados com *Giardia lamblia*.

WPI: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* e infectados com *Giardia lamblia*.

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, $p < 0,05$.

5.3. Análise da relação criptas intestinais e vilosidades intestinais

A relação entre criptas e vilosidades intestinais dos animais do grupo Ci ($0,1629 \pm 0,01822$) apresentou aumento significativo em relação aos grupos Cc ($0,07571 \pm 0,002974$), Blc ($0,1067 \pm 0,007993$) e WPC ($0,1067 \pm 0,01080$) ($p < 0,05$). No grupo BLi ($0,1978 \pm 0,01402$) a relação entre criptas e vilosidades apresentou aumento significativo quando comparado a relação dos animais dos grupos Cc ($0,07571 \pm 0,002974$), Blc ($0,1067 \pm 0,007993$) e WPC ($0,1067 \pm 0,01080$) ($p < 0,05$). Observamos que a relação entre criptas e vilosidades intestinais dos animais do grupo WPI ($0,1670 \pm 0,01257$) aumentou significativamente quando comparado aos grupos Cc ($0,07571 \pm 0,002974$), Blc ($0,1067 \pm 0,007993$) e WPC ($0,1067 \pm 0,01080$) ($p < 0,05$).

Contudo, não houve diferença significativa na relação cripta e vilosidades dos grupos Ci ($0,1629 \pm 0,01822$), BLi ($0,1978 \pm 0,01402$) e WPi ($0,1670 \pm 0,01257$) ($p < 0,05$) (Figura 4).

A relação altura da criptas intestinais/altura das vilosidades intestinais aumentou quando houve infecção, tanto em animais tratados previamente com *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4, como nos animais não tratados. O tratamento com os probióticos não alterou essa relação.

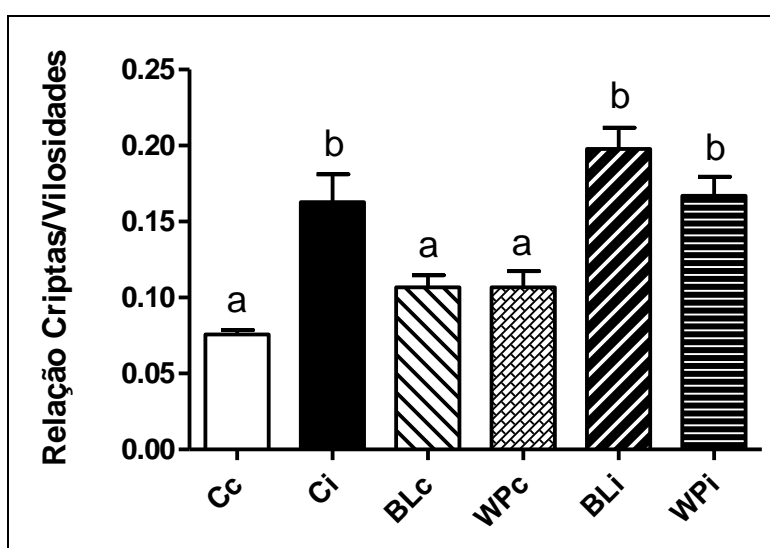


Figura 4: Relação entre criptas e vilosidades intestinais (duodeno) dos grupos experimentais.

Cc: Gerbils sem infecção.

Ci: Gerbils infectados com *Giardia lamblia*.

BLc: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* sem infecção.

Wpc: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* sem infecção.

BLi: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* e infectados com *Giardia lamblia*.

Wpi: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* e infectados com *Giardia lamblia*.

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, $p < 0,05$.

5.4. Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos trofozoítos

Nos cortes histológicos onde o anticorpo primário foi substituído por PBS, (Figura 5: A) não observamos reação positiva nos trofozoítos de *G. lamblia*. Por sua vez, a reação foi positiva nos cortes que receberam o anticorpo anti-*G. lamblia* (Figura 5: B, C e D). Observamos que os trofozoítos de *Giardia lamblia*, marcados através da reação imuno-histoquímica, foram encontrados em maior número no lúmen intestinal e/ou aderidos ao epitélio das vilosidades intestinais nos animais do grupo Ci (Figura 5: B) em relação aos animais do grupo BLi (Figura 5: C) e WLi (Figura 5: D).

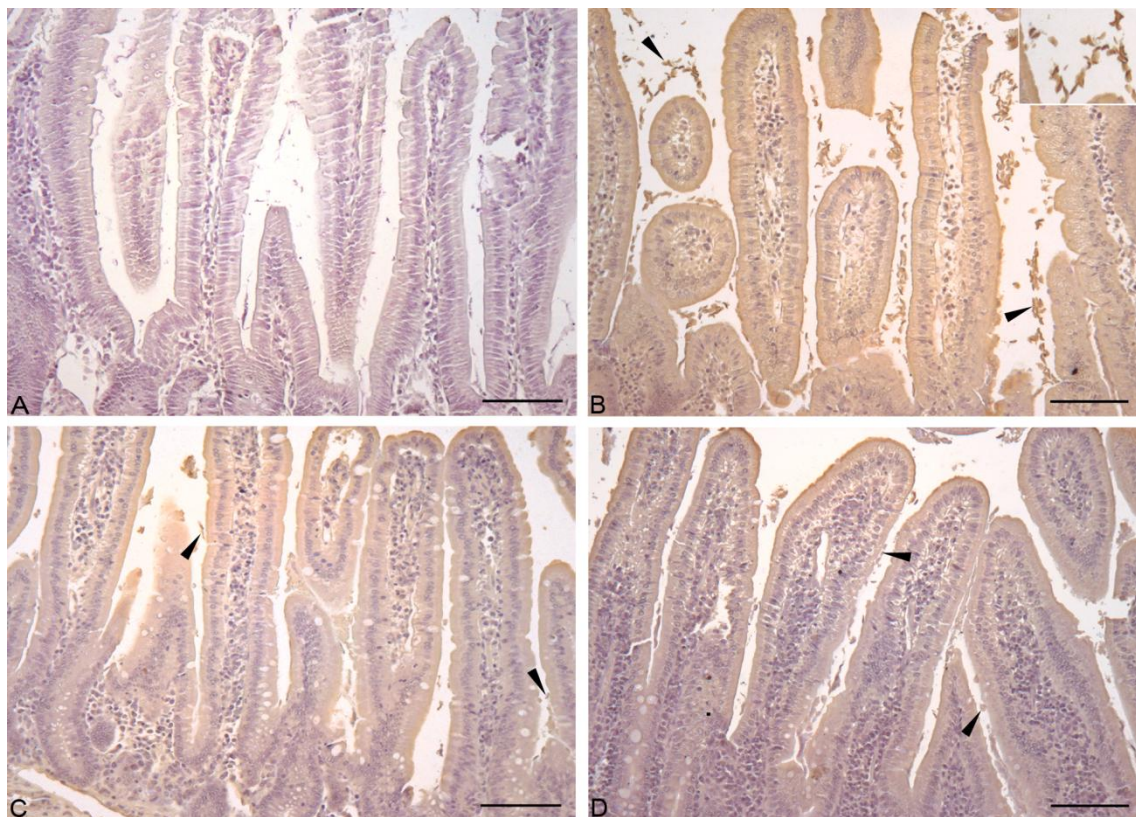


Figura 5: Fotomicrografia de imuno-histoquímica para trofozoítos de *Giardia lamblia*. (a) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para trofozoítos; (b) Grupo Ci: Presença de vários trofozoítos positivos (cabeças de seta) próximo às vilosidades; Inset (detalhe de trofozoitos marcados positivamente); (c) Grupo BLi: Escassos trofozoítos positivos aderidos às vilosidades (cabeças de seta); (d) Grupo WLi: Escassos trofozoítos positivos aderidos às vilosidades (cabeças de seta). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra = 100 μ m.

Igualmente, na análise quantitativa dos grupos avaliados, o grupo Ci ($57730 \pm 11260 \mu\text{m}^2$) apresentou aumento significativo da área de trofozoítos imunomarcados no lúmen e/ou aderidos nas vilosidades intestinais em relação aos animais dos grupos BLi ($17610 \pm 2338 \mu\text{m}^2$) e WLi ($16910 \pm 2281 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$) (Figura 6).

O tratamento com os probióticos *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4 reduziu bastante o número de trofozoítos quando comparado aos animais controle infectados.

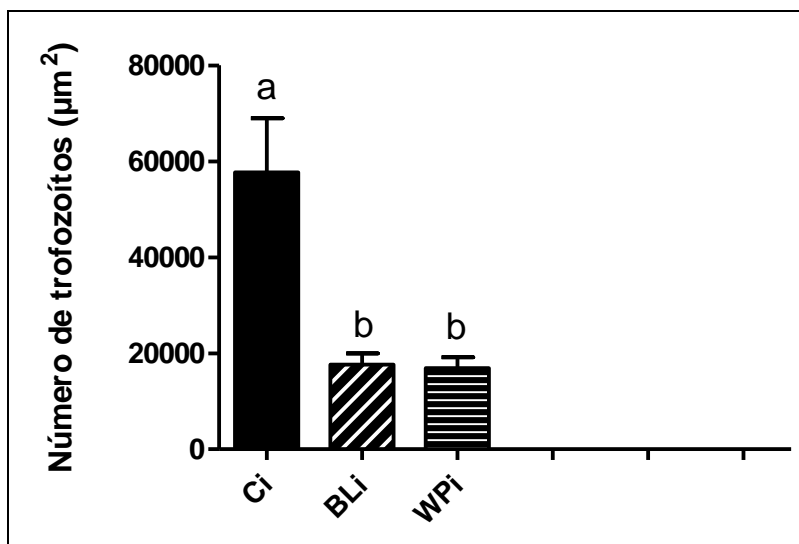


Figura 6: Número de trofozoítos no intestino delgado (duodeno) dos grupos experimentais.

Ci: Gerbils infectados com *Giardia lamblia*.

BLi: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* e infectados com *Giardia lamblia*.

WLi: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* e infectados com *Giardia lamblia*.

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão, $p < 0,05$.

5.5. Análise qualitativa e quantitativa da mucosa duodenal PAS positiva

A análise qualitativa da mucosa dos animais do grupo BLi (Figura 7: D) demonstrou aumento de amplas regiões PAS positivas tanto nas criptas e vilosidades, quanto na superfície intestinal, identificado pelo aumento do

número e tamanho de células caliciformes e presença de muco secretado nas criptas e vilosidades. Regiões PAS positivas menores do que as do grupo BLi e redução no número de células caliciformes com tamanho menor, foram observadas em todos os outros grupos de animais Cc, Ci, BLc (Figura 7: A, B e C) e nos animais dos grupos WPc e WPi (dados não mostrados).

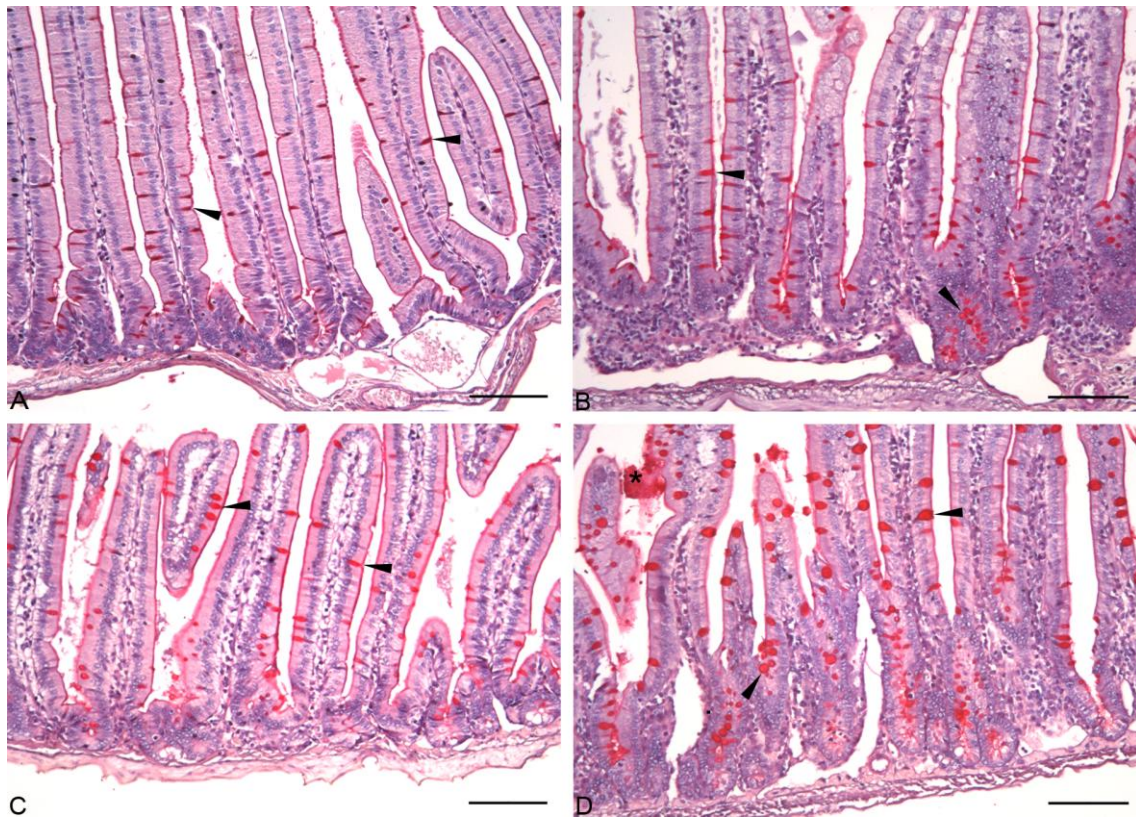


Figura 7: Fotomicrografia do intestino delgado dos grupos experimentais.

(a) Grupo Cc: Escassas células caliciformes (cabeças de seta); (b) Grupo Ci: Moderado número de células caliciformes (cabeças de seta); (c) Grupo BLc: Escassas células caliciformes (cabeças de seta); (d) Grupo BLi: Grande número de células caliciformes (cabeças de seta) e presença moderada de muco nas criptas e vilosidades intestinais (*). Ácido Periódico de Schiff (PAS). Barra = 100 μm .

Igualmente, na análise quantitativa o grupo BLi ($156000 \pm 21680 \mu\text{m}^2$) aumentou significativamente a área corada com PAS em relação aos grupos Cc ($93830 \pm 6954 \mu\text{m}^2$), Ci (103500 ± 17180), BLc ($100200 \pm 11950 \mu\text{m}^2$), WPc ($79900 \pm 3857 \mu\text{m}^2$) e WPi ($100200 \pm 7488 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ ($p < 0,05$)) (Figura 8).

Houve aumento significativo na produção de muco nos animais tratados *B. longum* 5^{1A} e infectados com *G. lamblia*. Os animais tratados com *W. paramesenteroides* WpK4 e infectados com *G. lamblia* apresentaram aumento de muco, porém não de forma significativa.

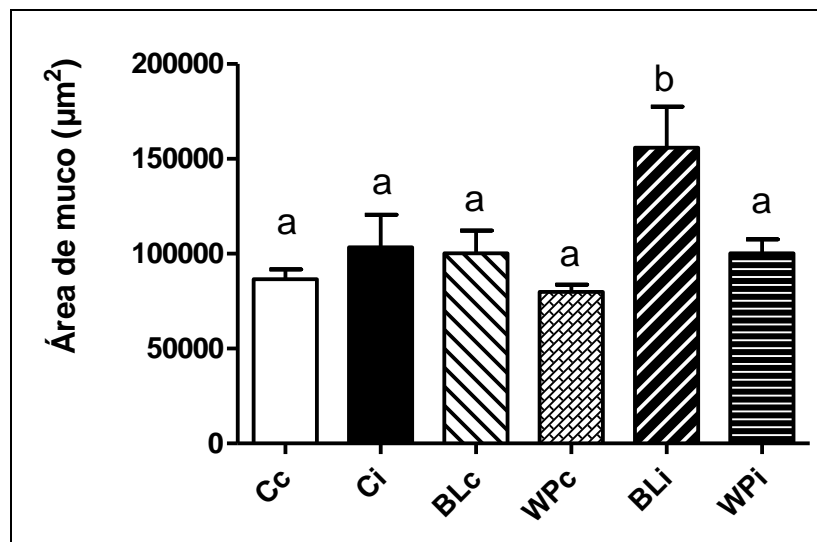


Figura 8: Área de muco na mucosa duodenal dos animais dos grupos experimentais.

Cc: Gerbils sem infecção.

Ci: Gerbils infectados com *Giardia lamblia*.

BLc: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* sem infecção.

Wpc: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* sem infecção.

BLi: Gerbils tratados com *Bifidobacterium longum* e infectados com *Giardia lamblia*.

Wpi: Gerbils tratados com *Weissella paramesenteroides* e infectados com *Giardia lamblia*.

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, $p < 0,05$.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A giardíase é uma infecção intestinal causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, o qual acomete principalmente crianças em fase escolar e animais jovens. A infecção merece considerável atenção em função das alterações anatomopatológicas ocasionadas no hospedeiro (Thompson 2000; Lane & Lloyd 2002). A giardíase pode originar quadros clínicos como diarreia e má-absorção intestinal. Para o controle da infecção estão disponíveis no mercado os nitroimidazóis. Porém, apesar de serem eficientes, desde 1962 diversos casos refratários têm sido relatados, incidindo também na resistência cruzada entre os diferentes nitroimidazóis (Upcroft & Upcroft, 2001). Diante do exposto, alternativas terapêuticas tornam-se muito atrativas. Os probióticos têm sido utilizados como adjuvantes terapêuticos em algumas patologias, principalmente as intestinais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito probiótico de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 sobre a giardíase em modelo murino (*Meriones unguiculatus*).

Os mecanismos pelos quais a *Giardia* provoca sintomas ainda não estão bem esclarecidos. A imunidade inata da mucosa representa a primeira linha de defesa contra infecções microbianas, assim, o estudo morfológico de alguns aspectos da mucosa do intestino delgado foi utilizado para avaliar as possíveis alterações decorrentes da associação entre probióticos e *Giardia*. Estimamos a altura das criptas e vilosidades intestinais, secreção de muco e quantificamos a carga parasitária.

Criptas de Lieberkühn ou criptas intestinais possuem epitélio simples colunar e fazem parte da camada mucosa do intestino. São glândulas tubulares simples encontradas entre as vilosidades da parede do intestino delgado (ID). Possuem células endócrinas que produzem hormônios como secretina, motilina, colecistoquinina e peptídeos inibidores gástricos que controlam a atividade e regulam o pH do ID. Têm também células de Paneth, que produzem substâncias bactericidas e fungicidas como lisozimas e defensinase. Por fim,

possuem células caliciformes, que secretam muco, lubrificante contendo mucina.

Estudos sugerem que a interação entre trofozoítos de *G. lamblia* e células epiteliais culmina no aumento da taxa de apoptose de enterócitos, levando à redução da regeneração celular e em consequência, ao achatamento das microvilosidades (Chin et al, 2002; Panaro et al, 2007; Pires et al, 2003). Casos assintomáticos de giardíase não produzem nenhuma alteração histológica na mucosa duodenal e jejunal (Wolfe 1992). Ao contrário, em casos sintomáticos há atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas, danos às células epiteliais e aumento de infiltrado inflamatório na lâmina própria (Brandborg et al, 1967; Khanna et al, 1988).

Por outro lado, a giardíase em animais experimentais, eventualmente pode gerar alterações na arquitetura intestinal, como a atrofia de criptas e vilosidades, afetando a atividade de enzimas digestivas, como dissacaridases, lipases e proteases. Goyal (2013) e colaboradores ao analisarem as propriedades antioxidantes de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) em camundongos BALB/c infectados com *G. lamblia*, observaram que os animais do grupo controle infectado tiveram alterações morfológica e celular na mucosa duodenal, apresentando maior atrofia das microvilosidades intestinais e hiperplasia das criptas intestinais. No mesmo estudo, os animais tratados com LGG e infectados com *G. lamblia* não demonstraram alterações histopatológicas na mucosa duodenal como no grupo controle.

Oberhuber e colaboradores (1997) investigaram 567 pacientes com biópsia duodenal positiva para *Giardia* e observaram que a porcentagem de indivíduos que apresentaram atrofia nas vilosidades e pequeno infiltrado inflamatório, foi relativamente baixo (3,7%) comparado ao total de amostras. Semelhante a este achado, voluntários infectados com isolados de *Giardia* da linhagem (B) exibiram infecção sintomática como prevista, porém, destes pacientes sintomáticos apenas 40% apresentaram atrofia de criptas e vilosidades intestinais (Nash et al, 1987).

Como podemos observar há muita controvérsia sobre os processos fisiopatológicos relacionados à giardíase, certamente estes são multifatoriais e podem estar relacionados às características do parasita, como cepa, número de cistos ingeridos, ou, podem relacionar-se às características do hospedeiro, como, a resposta imune, o estado nutricional, o pH do suco gástrico e a microbiota intestinal.

Em nosso estudo, os animais infectados com *G. lamblia* não apresentaram atrofia das vilosidades em comparação com os controles sem infecção e com probióticos. Concordando com nossos resultados Scott e colaboradores (2000) não observaram atrofia de vilosidades em camundongos experimentalmente infectados com *Giardia*. Contudo, estas diferenças podem se relacionar a fatores próprios do modelo experimental, a cepa de *Giardia* utilizada, a forma evolutiva, o tempo de infecção e/ou o estado imunológico e nutricional dos modelos usados. Desta forma, percebemos que há falta de padronização nos estudos para que se possa referenciá-los uns com os outros.

Assim, os mecanismos sugeridos como determinantes da patogenia giardiana, podem não se associar com o aumento da vilosidade intestinal. Um exemplo é o estado nutricional, a quem é creditado interferência direta na patogenia da giardíase, com agravamento da infecção via sinergismo da apoptose e consequente diminuição na renovação de enterócitos. Em decorrência, ocorre redução no número e na altura das vilosidades, acarretando redução na capacidade de absorção intestinal. (Pires et al, 2003).

Assim como Nash e colaboradores (1987), Amer e colaboradores (2014) observaram nos camundongos infectados com *G. lamblia*, atrofia expressiva das vilosidades intestinais, seguido de infiltrado inflamatório. Em constraste com este achado, no mesmo estudo, ao comparar a morfologia duodenal dos animais tratados com derivados de bacteriocinas de *Lactobacillus casei* e infectados com *G. lamblia*, os pesquisadores observaram que nestes animais, a mucosa aparentava normal, sem as alterações mencionadas em relação aos animais infectados e sem tratamento. Shukla e colaboradores (2012) observaram que a influência da administração da bactéria probiótica

Lactobacillus casei nos camundongos Balb/c foi positiva, uma vez que houve aumento na altura das vilosidades intestinais do grupo tratado e infectado com *G lamblia* em relação ao grupo controle infectado, o qual apresentou atrofia nas vilosidades intestinais.

Ao analisar a morfometria das criptas intestinais isoladamente, observamos que os grupos Ci, BLi e WPi apresentaram criptas significativamente mais alongadas em comparação aos grupos Cc, BLc e WPc. Entre os grupos infectados não observamos diferença estatística na altura das criptas intestinais, estando condizente aos achados de Scott e colaboradores (2000) ao utilizarem trofozoítos de *G. muris* em camundongos CD-1 (nu⁺/ nu⁺) e também de Bartelt e colaboradores (2013) ao utilizarem cistos de *G. lamblia* em camundongos C57BL/6. Os autores concluíram que as alterações causadas nestes animais foram semelhantes às ocorridas em humanos com giardíase crônica. As mudanças histopatológicas em resposta à infecção resumiu-se à redução da altura das vilosidades intestinais, aumento na altura das criptas e hiperplasia das mesmas, apoptose de enterócitos e aumento de eosinófilos intra-epiteliais.

Relatos indicam que o uso de determinadas linhagens probióticas pode aprimorar a atividade específica das dissacarídes (sacarase e lactase). Estas enzimas agem como biomarcadores de dano no epitélio intestinal, por conseguinte, quando expressas no topo das vilosidades intestinais poderão reduzir a lesão presente na borda em escova do intestino (Mahmood et al, 2005).

Na análise da razão criptas/vilosidades intestinais, observamos que a relação nos grupos Ci, BLi e WPi foi significativamente maior quando comparado aos grupos Cc, BLc e WPc. Este resultado está em concordância com os achados de Scott et al, 2004, que observaram aumento da razão criptas/vilosidades nos camundongos infectados em relação aos respectivos controles. Nos grupos infectados, os animais do grupo BLi atingiram maior valor da relação criptas/vilosidades, porém sem diferença significativa em relação aos outros grupos infectados. Já nos grupos sem infecção, os animais do grupo Cc

obtiveram menor valor da relação, embora não tenha sido observada diferença estatística entre esse e os grupos não infectados que receberam probióticos.

Na realidade, em nosso experimento, a hiperplasia das criptas ocorreu em detrimento da infecção giardiana. Uma explicação para este fenômeno talvez se sustente pela fase em que avaliamos a infecção (sete dias). Estudos anteriores demonstraram que o período exponencial da infecção em gerbils foi sete dias (Busatti, 2007). Neste período é observado imenso número de trofozoítos aderidos aos enterócitos epiteliais, contribuindo para a ocorrência de diversos eventos que conduziram à danificação da mucosa. Em resposta à esta agressão ocorreria a hiperplasia das criptas como tentativa de recuperação do tecido.

No intestino delgado, as células-tronco intestinais localizadas nas criptas dão origem à células de Paneth, bem como enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas (Simon-Assmann et al, 2007). Após a diferenciação, as células de Paneth permanecem nas criptas, enquanto que os outros tipos de células migram para as vilosidades. Poderíamos esperar assim, aumento também das vilosidades. Contudo, a despeito do aumento na altura das criptas intestinais ocorrer para regenerar as vilosidades, nem sempre sucede o aumento das mesmas, ou seja, muitas vezes o processo apoptótico é tão mais intenso, de modo que a hiperplasia criptal servirá apenas para atenuar a degeneração celular (Buret, 2007).

Utilizamos a coloração de PAS para verificar possíveis alterações na secreção de polissacarídeos sulfatados, carboxilados e de glicoproteínas que compõem o muco produzido através das células caliciformes dos grupos avaliados. A secreção de mucina pelas células caliciformes do intestino delgado é rapidamente aumentada em decorrência da presença de microrganismos patogênicos (Turner 2009). Durante o processo infeccioso gerado pela presença da *G. lamblia* observamos aumento significativo na produção de muco nos animais do grupo BLi, em relação aos animais dos grupos Cc, Ci, BLc, WPc e WPi. Desde modo, estes resultados mostram que o aumento da produção de muco foi decorrente da presença do *B. longum* 5^{1A}.

Zenian and Gillin (1985) ao examinar a influência da mucina humana sobre a adesão e sobrevivência de trofozoítos de *G. lamblia in vitro*, perceberam aumento significativo na adesão dos trofozoítos expostos ao muco originado de intestino humano (*post-mortem*), sugerindo que o muco criaria um micro-ambiente entre o lúmen e o epitélio, protegendo o parasito da degradação por enzimas, sais biliares e diferenças de pH. Embora o muco aja na proteção do epitélio intestinal contra enzimas digestivas do hospedeiro, Roskens & Erlandsen (2002), constataram que o muco funcionava como fator de privação dos trofozoítos de *G. lamblia* da adesão ao epitélio intestinal e, desta maneira, apresentava efeito negativo, sobretudo na adesão do parasito *in vitro*. Zinneman & Kaplan (1972) acreditam que o muco protegeria os trofozoítos da lise por agentes lípases presentes no fluido intestinal. Com base nessas informações é necessário que haja outras investigações para elucidar a importância das mucinas na resposta do hospedeiro em presença da giardíase, com efeito de beneficiar ou prejudicar o parasitismo.

Estudos utilizando camundongos e humanos indicam que os benefícios gerados com a administração de linhagens probióticas devem ser medidos em parte através da capacidade imunomoduladora de determinadas cepas ou a combinação de mais cepas. Probióticos podem servir como terapia alternativa para doenças gastrointestinais capazes de induzir respostas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias ou secretórias, além das aplicações voltadas à redução da colonização de patógenos, melhoria na síntese de vitamina, estimulação na proliferação e diferenciação de células epiteliais, fortificação da barreira intestinal e otimização do trânsito intestinal (Leblanc et al, 2008; Thomas & Versalovic, 2010; Vandenplas et al, 2014).

Em nosso estudo, ao avaliarmos o efeito da administração de *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4 nos animais através da imunomarcagem de trofozoítos, observamos que o número de trofozoítos dos grupos BLi e WPi foi significativamente menor em relação ao grupo Ci, mostrando que a administração prévia das bactérias reduziu significativamente o número de parasitos intestinais.

Yeonhee Lee (2005) ao trabalhar com diversos isolados do trato vaginal de mulheres Coreanas na pré-menopausa especialmente o isolado *Weissella kimchii* (PL9023), demonstrou sua atividade inibitória para *Candida albicans* em vários pHs inviabilizando a ligação do fungo as células do epitélio vaginal. Além disso, observou a produção de peróxido de hidrogênio que levou a produção de proteínas com propriedade antimicrobiana conhecida por bacteriocinas.

O interessante das linhagens bacterianas testadas é que são isolados brasileiros com potencial probiótico que se mostraram eficientes em proteger o hospedeiro da giardíase. A manipulação e crescimento de *W. paramesenteroides* WpK4 são fáceis viabilizando possíveis usos em escala industrial. Já espécies de *Bifidobacterium* são muito utilizadas como probióticos para fins terapêuticos em recém-nascidos e lactentes, por sua alta capacidade de colonizar o trato gastrointestinal. Muñoz et al (2011) avaliaram a *in vitro* a influência de *B. longum* subsp. *infantis*, no tratamento da diarreia causada por rotavírus, demonstrando capacidade de proteger a célula contra a infecção e habilidade para inibir a replicação do rotavírus.

Nossos resultados impactam positivamente para o possível controle da giardíase com a administração das bactérias *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4 como coadjuvantes. Casos resistentes ao tratamento convencional talvez possam ser menos agressivos com o uso de probióticos. Os mecanismos pelos quais ocorrem esta importante redução da carga parasitária precisam ser ainda elucidados. Contudo os resultados da produção de muco em animais tratados com *B. longum* sinalizam para este efeito na diminuição da carga parasitária.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- A altura das criptas intestinais e a relação altura das criptas/ altura das vilosidades aumentou quando houve infecção, tanto em animais tratados previamente com *B. longum* 5^{1A} e *W. paramesenteroides* WpK4 como nos animais não tratados;
- O tratamento com os probióticos e a infecção por *Giardia* não alteraram a altura das vilosidades intestinais;
- A redução significativa da carga parasitária observada pela administração de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em Gerbils (*Meriones unguiculatus*) sugere ação probiótica dessas bactérias na giardíase;
- O aumento da produção de muco esteve associado à diminuição da carga parasitária nos animais tratados com *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, sugerindo que o muco possa constituir um dos mecanismos usados pelo probiótico na redução da carga parasitária.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Adam RD (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews, 14(3):447–475.

Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA (2001). Probiotic Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy. Clin. Infect. Dis, 32: 1567-1576.

Andersen MD, Neumann NF (2007). *Giardia intestinalis*: new insights on an old pathogen. Med Microbiol. 18: 35-42.

Araújo NS, Mundim MJS, Gomes MA, Amorim MRR, Viana JC, Queiroz RP, Rossi MA, Cury MC (2008). *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. Exp. Parasitol, 118: 449-57.

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

Basso RM, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BC (2008). Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among schoolchildren in Caxias do Sul, RS. Rev Soc Bras Med Trop, 41(3):263-268.

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

Boirivant M & W Strober (2007). The mechanism of action of probiotics. Curr. Opin. Gastroenterol, 23:679–692.

Botelho, L. Isolamento e identificação de Lactobacilos e Bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Campinas, 2005, 203 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2005.

Brandborg LL, CB Tankersley, S Gottlieb, M Barancik, VE Sartor (1967). Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology*, 52:143- 150.

Buret A, Gall DG, Olson ME (1991). Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol Res*, 77: 109-114.

Buret AG, Hardin JA, Olson ME, Gall G (1992). Pathophysiology of the small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*, 125: 11–19.

Bussatti HGNO, Santos JFG, Gomes MA (2009). The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Biologics: Targets and Therapy*, 3: 273-87.

Caccio SM, Ryan U (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*, 160(2): 75-80.

Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, DE Albuquerque CP, Leite JP, Bóia MN (2007A). Detection of *Cryptosporidium* spp and other intestinal parasites in children with acute diarrhea and severe dehydration in Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*, 40(3): 346-348.

Chen TL, Chen S, Wu HW, Lee TC, Lu ZY, Wu LL, Ni YH, Sun CH, Yu WH, Buret AG, Yu LCH (2013). Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathogens*, 5: 26.

Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG (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.

Chirgwin SR, Coleman SU, Porthouse KH, Nowling JM, Punkosdy GA, Klei TR (2003). Removal of *Wolbachia* from *Brugia pahangi* is closely linked to worm

death and fecundity but does not result in altered lymphatic lesion formation in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Infect. Immun*, 71: 6986–6994.

Collins MD, et al (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, Washington, 75: 595 - 603.

Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J & Wallbanks S (1993). Taxonomic studies on some Leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Bacteriol*, 75: 595–603.

Cotton JA, Beatty JK, Buret AG (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*, 41: 925-933.

Cross ML (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 34: 245-253.

Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Jimenez JC, Rojas R, Gil M, Mata E (1998). Association between giardiasis and allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol*, 81: 261–265.

Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 431–432.

Dizdar V, Gilja OH, Hausken T (2007). Increased visceral sensitivity in *Giardia* induced postinfectious irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. Effect of the 5HT3-antagonist ondansetron. *Neurogastroenterol Motil*, 19: 977-982.

Duerr CU, Hornef MW (2012). The mammalian intestinal epithelium as integral player in the establishment and maintenance of host-microbial homeostasis. *Semin Immunol*, 24: 25–35.

E O'Halloran A, Hogan K, Mealy (2010). Metronidazole-Induced Pancreatitis. HPB surgery : a world journal of hepatic, pancreatic and biliary surgery. 2010: 1-4.

Earnshaw WC (1995). Apoptosis: lessons from in vitro systems. Trends Cell Biol, 5: 217–220.

Eckmann L (2003). Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunology, 25: 259-270.

Eglal I Amer, Shereen F Mossallam, Hoda Mahrous (2014). Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. Experimental Parasitology, 146: 52–63.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO - World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bacteria. Cordoba, 2001.

FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines

Gardner TB, Hill DR (2001). Treatment of Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews, 14(1): 114-128.

Gil Frederico F, Barros Maxlene J, Macedo Nazaré A, G E Júnior Carmelino, Redoan Roseli, Busatti Haendel, Gomes Maria A, Santos Joseph F G, (2013). Prevalence of intestinal parasitism and associated symptomatology among hemodialysis patients. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 55: 69-74.

Gillin FD, Reiner DS, Mccaffery JM (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu Rev Microbiol, 50: 679–705.

Haque R, Mondal D, Karim A, Molla IH, Rahim A, Faruque ASG, Ahmad N, Kirkpatrick BD, Houpt E, Snider C, Petri WAJ (2009). Prospective Case-Control Study of the Association between Common Enteric Protozoal Parasites and Diarrhea in Bangladesh. Clin Infect Dis, 48(9): 1191-1197.

Haque RMB, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Jr Petri WA (2003). Amebiasis. *The new england journal of medicine*,348(16): 1565-1573.

HD Lujan, MR Mowatt, TE Nash (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 61: 294-304.

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

Hetsko ML et al (1998). Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Exp. Parasitol*, 88: 172–183.

Hoon Kim, Young Woo Kim, Seoung Rim Kim, Ik Seong Park, Kwang Wook Jo (2011). Metronidazole-induced encephalopathy in a patient with infectious colitis: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 5: 1-4.

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336: 1268–73.

Hooper LV, Macpherson AJ (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Ver Immunol*, 10: 159–69.

Hörman A, Korpela H, Sutinen J, Wedel H, Hänninen ML (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.

Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr*, 73(Suppl2): 444-450.

Jensen LA, Marlin JW, Dyck DD, Laubach HE (2009). Prevalence of multi-gastrointestinal infections with helminth, protozoan and *Campylobacter* spp. in Guatemalan children. *Journal Infect Developing Countries*, 3(3): 229-234.

Karr CD & Jarroll EL (2004). Cyst wall synthase: *N*-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel *N*-

acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiology*, 150: 1237–1243.

Keister DB (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 487–488.

Khanna R, Vinayak VK, Mehta S, Kumkum Nain CK (1988). *Giardia lamblia* infection in immuno suppressed animals causes severe alterations to brush border membrane enzymes. *Dig Dis Sci*, 33:1147–1152.

Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, Houpt E, Newman RD, Sears CL, Lima AA, Guerrant RL (2008). *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102: 718-725.

Korkes F, Kumagai FU, Belfort RN, Szejnfeld D, Abud TG, Kleinman A, Florez GM, Szejnfeld T, Chieffi PP (2009). Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in an urban slum. *J Trop Pediatr*, 55(1): 42-45.

Kulda J & Nohynkova E (1996). *Giardia* in humans and animals. In Kreier, J. P. *Parasitic protozoa*, 2(10):225–422.

Lambl W (1859). Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr. Prakst. Heikunde*, 61:1–58.

Lane S & Lloyd D (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol*, 28: 123–147.

Laparra JM, et al (2012). *Bifidobacterium longum* cect 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *Plos One*, 7:307-344.

Larocque R, Nakagaki K, Lee P, Abdul-Wahid A, Faubert GM (2003). Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun*, 71: 5662–5669.

Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML (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.

Leblanc AM, Chaves S, Carmuega E, Weill R, Antóine J, Perdigon G (2008). Effect of long-term continuous consumption of fermented Milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology*, 213: 97-108.

Lee JH; O'Sullivan DJ (2010). Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74:378–416.

Louis PO' Byrne C P (2010). Life in the gut: microbial responses to stress in the gastrointestinal tract. *Sci Prog*, 93:7–36.

Lujan HD & Touz MC (2003). Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology*, 5: 427–434.

M Belosevic, GM Faubert, JD Maclean (1989). Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut*, 30: 1213-1219.

M Benchimol (2004). Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia ambliia*. *Biol. Cell*, 96: 291-301.

Machado ER, Santos DS, Costa-Cruz JM (2008). Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41(6):581-585.

Maia-Brigagão C, Morgado-Díaz JA, De Souza W (2012). *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol Int*, 61: 280-287.

Menezes AL, Lima VM, Freitas MT, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS (2009). Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the

city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50(1): 57-59.

Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V (1999). Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53: 69-74.

Mohammadi SS, Genkinger JM, Loffredo CA, Singer SM (2010). A Meta-analysis of the Effectiveness of Albendazole Compared with Metronidazole as Treatments for Infections with *Giardia duodenalis*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4(5): 682.

Monis PT, Caccio SM, Thompson ARC (2009). Variation in *Giardia*: towards a Moreno AC, Filho AF, Gomes TA, Ramos ST, Montemor LP, Tavares VC, Filho LS, Irino K, Martinez MB (2010). Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66(1): 50-57.

Muñoz JA, Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Ramón D, Genovés S, Montava R, Ribes JM, Buesa J, Fàbrega J, Rivero M (2011). Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl Environ Microbiol*, 77: 8775–8783.

Nash TE et al, (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis*, 156: 974–984.

Nisha Goyal, Praveen Rishi, Geeta Shukla (2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. *World J Microbiol Biotechnol*, 29:1049–1057.

O'handley RM, Buret AG, Mcallister TA, Jelinski M, Olson ME (2001). Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. *Int. J. Parasitol*, 31: 73–79.

O'Hara JR, Buret AG (2008). Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front. Biosci*, 13: 7008–7021.

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

Osvath R (2000) FDA food advisory committee to discuss criteria for safety of probiotics. Food Chem News, 42:12.

Ozen AE, et al (2012). Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. Nutrition Reviews, 70(8): 472-481.

Paget TA, Macechko PT & Jarroll EL (1998). Metabolic changes in *Giardia intestinalis* during differentiation. J. Parasitol, 84: 222–226.

Palomar MM, Galdeano CM, Perdigón G (2014). Influence of a probiotic lactobacillus strain on the intestinal ecosystem in a stress model mouse. Brain, Behavior, and Immunity, 35: 77-85.

Pereira MG, Atwill ER, Barbosa AP (2007). Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 49(3): 139-145.

Pires ALG, Silveira TR, Silva VD (2003). Estudo morfológico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. J. Pediatr (Rio J.), 79: 329–336.

Qin J , Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, 464:59–65.

R Bernander, JE Palm, SG Svard (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell. Microbiol, 3:55-62.

Ratanapo S, Mungthin M, Soontrapa S, Faithed C, Siripattanapipong S, Rangsin R, Naaglor T, Piyaraj P, Taamasri P, Leelayoova S (2008). Multiple modes of transmission of giardiasis in primary schoolchildren of a rural community, Thailand. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78(4): 611-615.

Roskens H and Erlandsen SL (2002). Inhibition of *in vitro* attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. J. Parasitol, 88: 869–873.

Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG (2006). *Giardia* immunity- an update. Trends Parasitol, 22: 26-31.

Safrun Mahmood, Kamaljit Kaur, Nidhi Mittal, Akhtar Mahmood (2005). *Giardia lamblia*: Expression of alkaline phosphatase activity in infected rat intestine. Experimental Parasitology, 110: 91–95.

Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC (2012). Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, 106(8):473-479.

Savioli L, Smith H, Thompson A (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends in Parasitology, 22: 203–208.

Schell MA, et al (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99: 14422–14427.

Schlee M, et al (2008). Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. Clin. Exp. Immunol, 151: 528–535.

Scott KG, Yu LC, Buret AG (2004). Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. Infect. Immun, 72: 3536–3542.

Scott KGE, Logan MR, Klammer GM, Buret AG (2000). Jejunal brush border microvillous alterations in *G. muris*-infected mice: role of T lymphocytes and Interleukin-6. Infect. Immun, 68: 3412-3418.

Shukla G, Kaur H, Sharma L (2013). Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. Parasitol. Res, 112 (6): 2143–2149.

Shukla G, Sidhu RK, Verma A (2012). Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei*

supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102 (1): 61–72.

Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M (2007). In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol. Toxicol*, 23: 241–256.

Slifko TR, Smith HV & Rose JB (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*,30: 1379-1393.

Smith M I, Yatsunencko T, Manary M J, Trehan I, M kakosya R, Cheng J,et al (2013). Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*, 339: 548–54.

Snel, SJ, Bakeri MG, Kamalesh V, French N, Learmonth J (2009). A tale of two parasites: the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. *Epidemiology and Infection*, 137: 1641-1650.

Solomons NW (1982). Giardiasis: nutritional implications. *Rev. Infect. Di, (Suppl I) 4(4): 859-869.*

Souza TC, et al (2013). In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Beneficial Microbes*, 4(2) 179-186.

Stanley JR (2003). Amoebiasis. *Lancet*, 361: 1025-1034.

Tashima NT, Simões MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC (2009). Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 51(1): 19-24.

Tejman-Yarden N, Millman M, Lauwaet T, Davids BJ, Gillin FD, Dunn L, Upcroft JA, Miyamoto Y, Eckmann L (2011). Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 55: 4643– 4651.

Thomas C, & Versalovic J (2010). Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*, 1: 148–163.

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

Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW (1993). *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*, 32: 71-160.

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

Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, From M, & Schulzke JD (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56: 328-335.

Upcroft P, Upcroft JA (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol*, 14: 150 –164.

Viegas RP (2008). Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Walzer PD, MS Wolfe, MG Schultz (1971). Giardiasis in Russia. *J. Infect. Dis*, 124: 235 – 237.

Wolfe MS (1992). Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1): 93-100.

Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JÁ (2003). Efficacy of anti giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf*, 2: 529 –541.

Yeonhee Lee (2005). Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiology Letters*, 250: 157 - 162.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta