



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

Ação de microemulsão incorporada com levamisol *in vivo* como imunomodulador em presença de *Giardia lamblia*.

Mara Rosa Gil Hernandez

Belo Horizonte-MG

2015

MARA ROSA GIL HERNANDES

Ação de microemulsão incorporada com levamisol *in vivo* como imunomodulador em presença de *Giardia lamblia*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Grau Acadêmico de Doutor em Ciências: Parasitologia

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luzia França

Co-orientador: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honorio França

Belo Horizonte-MG

2015

043

Hernandes, Mara Rosa Gil.

Ação de microemulsão incorporada com levamisol in vivo como imunomodulador em presença de *Giardia lamblia* [manuscrito] / Mara Rosa Gil Hernandez. – 2015.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Eduardo Luzia França. Co-orientadora: Adenilda Cristina Honorio França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. *Giardia lamblia* - Teses. 2. Resposta imune - Regulação - Teses. 3. Levamisol. 4. Microemulsão. 5. Parasitologia - Teses. I. França, Eduardo Luzia. II. França, Adenilda Cristina Honorio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

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

TÍTULO: Ação de microemulsão incorporada com levamisol *in vivo* como imunomodulador em presença de *Giardia lamblia*.

AUTOR: MARA ROSA GIL HERNANDES

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO LUZIA FRANÇA

CO-ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a ADENILDA CRISTINA HONÓRIO FRANÇA

Aprovada em 27 de maio de 2015.

Comissão Examinadora:

Dr. Eduardo Luzia França – UFMT

Dr. Aníbal Monteiro Magalhães – UFMT

Dra. Danny Laura Gomes Fagundes – UFMT

Dra. Maria Aparecida Gomes – UFMG

Dr. Stefan Michael Geiger – UFMG

Dra. Adenilda Cristina Honório França – UFMT

Belo Horizonte-MG – 2015

Dedico esta conquista, com muito amor e gratidão:

A Deus, por me conceder mais esta oportunidade de estar na Terra.

A Jesus de Nazaré, meu mestre maior, meu amigo de todas as horas, aquele que segura na minha mão nos meus momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pelo exemplo de caráter e dignidade, por todos os ensinamentos, amor, carinho, e pelo exemplo de superação demonstrado diariamente.

Ao meu filho, meus irmãos, minha cunhada, meu cunhado, meus sobrinhos, enfim, a toda a minha família, que sempre foi a fortaleza onde me apoiei.

Ao meu companheiro, pelo estímulo e apoio nos meus momentos de dificuldade e inseguranças.

Agradecimentos

Meu projeto só se concretizou porque teve o empenho e a colaboração direta e indireta de muitas pessoas, a quem serei sempre grata.

Agradeço, em especial:

Ao meu orientador, Dr. Eduardo Luzia França, pelas contribuições científicas, por me encorajar nos momentos difíceis e inseguros desta trajetória, pela amizade e dedicação.

À Profa. Dra. Adenilda Cristina Honorio-França, co-orientadora e parceira, além das contribuições no trabalho, agradeço a confiança depositada em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela oportunidade deste trabalho.

À Coordenadora Profa. Dra. Érika Martins Braga, por toda a dedicação destinada ao Programa, pela paciência e conhecimento transmitido.

Aos Professores do Programa DINTER, pela experiência transmitida, dedicação e persistência em acreditar no potencial do grupo.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes e ao Sr. João da Costa Viana, Equipe do Laboratório de Amebíase ICB/UFMG, por ceder as amostras das giárdias sempre que necessitei.

Aos todos os colegas de Doutorado, pelos momentos de amizade e de estudo compartilhados, em especial à Nathalia e Isabella, com quem convivi enquanto estava em Belo Horizonte, companhias alegres e carinhosas; à Lucélia, que ao longo deste projeto tornou-se uma amiga, serei sempre agradecida pela sua colaboração.

À dona Lúcia, a dona da pensão, que me acolheu com tanto carinho e zelo.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o doutorado.

O meu muito obrigada às secretárias do Curso, Sumara e Sibebe, pela presteza e carinho que sempre me atenderam.

Agradeço aos voluntários que gentilmente se dispuseram a participar desta pesquisa

*"Desistir... eu já pensei seriamente nisso,
mas nunca me levei realmente a sério;
é que tem mais chão nos meus olhos
do que o cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos,
do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração
do que medo na minha cabeça."*

Cora Coralina

COLABORADORES

Laboratório de Imunomodulação e Cronobiologia, ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças

- MT

Prof. Dr. Eduardo Luzia França

Profa. Dr^a. Adenilda Cristina Honorio-França

Profa. Dra. Lucélia Albuquerque Campelo de Moraes

Prof. MsC. Elton Brito Ribeiro

Laboratório de Amebíase, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte-

MG.

Prof.^a Dra. Maria Aparecida Gomes

Instituições Parceiras:

Universidade Federal de Mato Grosso- UFMT

Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG

Suporte Financeiro

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMAT- Fundação para o Amparo à Pesquisa de Estado de Mato Grosso

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 GIARDÍASE E EPIDEMIOLOGIA	16
1.2 <i>Giardia lamblia</i>	17
1.2.1 Morfologia	19
1.2.2 Ciclo biológico e transmissão	20
1.3 PATOGÊNESE	23
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA	25
1.5 IMUNOMODULAÇÃO E ATIVIDADE FUNCIONAL DE FAGÓCITOS	28
1.6 DIAGNÓSTICO	30
1.6.1 Clínico	30
1.6.2 Laboratorial	30
1.7 TRATAMENTO	32
1.8 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS	32
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 COMPOSIÇÃO DOS SISTEMAS	41
4.1.1 Desenvolvimento dos sistemas microemulsionados	41
4.1.2 Construção de diagramas de fases pseudoternários	42
4.1.3 Seleção dos sistemas microemulsionados	42
4.1.4 Estudo de densidade aparente	42
4.1.5 Preparo das formulações	43
4.1.6 Tamanho das partículas do sistema microemulsionado	43

4.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	43
4.3	SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	43
4.4	PARASITOS.....	44
4.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	45
4.5.1	Tratamento dos fagócitos do sangue pelo sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol (MELe)	45
4.6	IMUNOFENOTIPAGEM	45
4.7	ENSAIO DE VIABILIDADE.....	45
4.8	ENSAIO DE FAGOCITOSE E ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA.	46
4.9	ENSAIO DE APOPTOSE.....	47
4.10	LIBERAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR PELOS FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	48
4.11	ASPECTOS ÉTICOS.....	48
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5	RESULTADO.....	50
5.1	PREPARAÇÃO DO SISTEMA MICROEMULSIONADO.....	51
5.2	IMUNOFENOTIPAGEM	54
5.3	ÍNDICE DE VIABILIDADE.....	55
5.4	ÍNDICE DE FAGOCITOSE DE CÉLULAS MN DO SANGUE PARA <i>G. lamblia</i>	56
5.5	ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA.....	57
5.6	ÍNDICE DE APOPTOSE.....	58
5.7	LIBERAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR PELOS FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	59
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÕES.....	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....		85
Anexo 1	– Parecer do comitê de ética.....	86
Anexo 2	– Termo de consentimento livre e esclarecido	88

Lista de Tabelas

Tabela I. Imunofenotipagem de linhagens celulares do sangue periférico, caracterizando as células mononucleares..... 54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia: do trofozoítio (a) e do cisto (b) de <i>Giardia lamblia</i>	20
Figura 2	Ciclo de vida da giárdia e transmissão.....	21
Figura 3	Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.....	34
Figura 4	Diagramas pseudoternário de classificação dos pontos (a) e de domínios de região com as microemulsões selecionadas (b) do sistema SP/TW/BT. *Microemulsão líquida (MEL), Microemulsão gel (MEG), Emulsão gel (EG), Separação de Fases (SF)	52
Figura 5a.	Tamanho das partículas do sistema microemulsionado MELe	53
Figura 5b.	Imagens das microemulsões selecionadas do sistema SP/TW/BT. (A) Microemulsão líquida (MEL); (B) Separação de Fases (SF), (C) Microemulsão Levamisol (MLe)	53
Figura 6	Índice de viabilidade (%) dos fagócitos MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe)	55
Figura 7	Índice de fagocitose (%) das células MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe) na presença de <i>G.lamblia</i>	56
Figura 8	- Atividade anti-parasitária (%) das células MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe) na presença de <i>G.lamblia</i>	57
Figura 9	Índice de apoptose (%) das células MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe) na presença de <i>G.lamblia</i>	58
Figura 10	Liberação de cálcio intracelular por fagócitos mononucleares (MN) do sangue na presença de na presença de <i>G.lamblia</i> , indicado pela intensidade de fluorescência.	59
Figura 11	Intensidade de liberação de Ca ²⁺ pelos fagócitos MN do sangue tratados por levamisol, microemulsão e levamisol incorporado à microemulsão .	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BT	1-Butanol
BSA	Albumina Bovina Sérica
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CD3⁺	Agrupamento de diferenciação de Linfócitos T
CD4⁺	Agrupamento de diferenciação de Linfócitos TCD4 ⁺
CD8⁺	Agrupamento de diferenciação de Linfócitos TCD8 ⁺
CD14⁺	Agrupamento de diferenciação de glicoproteína expressa na membrana de monócitos
CD19⁺	Agrupamento de diferenciação de Linfócitos B
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DNA	Àcido Desoxiribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EG	Emulsão gel
EPF	Exame Parasitológico de Fezes
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (corante utilizado na marcação por conjugação de anticorpos)
FAPEMAT	Fundação para o Amparo à Pesquisa de Estado de Mato Grosso
IgG	Imunoglobulina G
MEG	Microemulsão gel
MEL	Microemulsão líquida
MELe	Sistema microemulsionado de levamisol

MN	Leucócitos mononucleares do sangue humano
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação de cadeia polimerase
PerCP	Complexo de Proteínas Peridininina Clorofila
PS	Polissorbato 80
PBS	Tampão Fosfato Salino
RNA	Ácido Ribonucleico
SF	Separação de Fases
SP	(Span 80) Oletado de sorbitano
SP/TW/BT	Sistema de microemulsão composto por Água destilada, Triglicéridos de ácido cáprico/caprílico, Oletado de sorbitano (Span 80), Polissorbato 80 (Tween 80) e 1-butanol (BT)
TCC	Triglicéridos de ácido cáprico/caprílico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
SGLT-1	Transportador ativo de glicose dependente de sódio
TW	Tween 80®
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso

RESUMO

A giardíase é uma das infecções parasitárias humanas mais comuns em todo o mundo, afeta centenas de milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento. A *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) é um protozoário que parasita o intestino humano. As infecções por *G. lamblia* são mais comuns em crianças, com prevalência de aproximadamente 20% no Brasil. Vários mecanismos de defesa têm sido propostos para eliminar a infecção por *G. lamblia*, entre estes a atividade de fagócitos. Por outro lado, o tratamento da giardíase utiliza terapia de drogas antiparasitárias, porém em 20% dos casos o tratamento não é eficaz, ocorrendo, muitas vezes, resistência e efeitos colaterais. Assim, com a finalidade de melhorar a eficácia ou redução da toxicidade dos fármacos, as microemulsões apresentam-se como uma alternativa de forma farmacêutica interessante para veiculação de moléculas com atividade terapêutica. A utilização destes veículos é uma alternativa viável para o controle de liberação de estímulos que modulam o sistema imunológico. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da atividade funcional de fagócitos mononucleares (MN) do sangue pelo sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol na presença de *G. lamblia*. Foi utilizada uma formulação microemulsionada líquida incorporada com cloridrato de levamisol (MELe) a partir de Oletado de sorbitano, Polissorbato 80, 1-butanol, triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico e água destilada. A modulação da atividade funcional dos fagócitos MN por esta formulação foi avaliada através da liberação de superóxido, da atividade fagocítica/microbicida, da apoptose e da liberação de cálcio intracelular. Observou-se que os fagócitos MN tratados com microemulsão incorporada com levamisol aumentou a atividade fagocítica, os índices microbicidas e induziu apoptose. Estes dados comprovam que a microemulsão foi capaz de melhorar a eficácia terapêutica do levamisol, potencializando a atividade funcional destas células. Dessa forma, aMELe pode ser uma alternativa adequada para o aproveitamento mais eficiente dos potenciais imunológicos e aplicado no tratamento a infecções por *G. lamblia* e minimizando os efeitos colaterais.

Palavras-chaves: *Giardia lamblia*, imunomodulação, levamisol, microemulsão

ABSTRACT

ABSTRACT

Giardiasis is one of the most common human parasitic infections worldwide, affecting hundreds of millions of people, particularly in developing countries. The *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) is a protozoan parasite that the human gut. *G. lamblia* infections are more common in children, with a prevalence of approximately 20% in Brazil. Several defense mechanisms have been proposed to eliminate the infection by *G. lamblia*. Among them the activity of phagocytes. On the other hand, treatment of giardiasis utilizes antiparasitic drugs therapy, but in 20% of the cases the treatment is ineffective, occurring often resistance and side effects. Thus, the purpose of enhance efficacy or reducing toxicity of the drugs, microemulsions present themselves as an alternative dosage form for placement interesting molecules with therapeutic activity. The use of these vehicles is a viable alternative to control the release of stimulus which modulate the immune system. Thus aim of this study was to evaluate the modulation of the functional activity of mononuclear phagocytes (MN) the blood of the microemulsion system levamisole hydrochloride in the presence of *G. lamblia*. A liquid microemulsion formulation incorporated with levamisole hydrochloride (mole) from Oletado sorbitan, polysorbate 80, 1-butanol, triglycerides of capric/caprylic acid and distilled water was used. The modulation of the functional activity of phagocytes MN for this formulation was evaluated by the release of superoxide, the phagocytic/microbicidal activity, apoptosis and intracellular calcium release. It was observed that the MN phagocytes treated with levamisole microemulsion incorporated with increased phagocytic activity indexes microbicides and induced apoptosis. These data show that the microemulsion is able to improve the therapeutic efficacy of levamisole, increasing the functional activity of these cells. Thus, Amele may be a suitable alternative for the efficient utilization of potential immunological treatment and applied to infection by *G. lamblia* and minimizing side effects.

Key words: *Giardia lamblia*, immunomodulation, levamisol, microemulsion

1 INTRODUÇÃO

A giardíase é uma das infecções parasitárias humanas mais comuns do trato intestinal em todo o mundo, afeta centenas de milhões de pessoas, sobretudo, nos países em desenvolvimento (Savioli et al. 2006). Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas têm giardíase sintomática (Sulaiman et al. 2003), porém acreditam-se que esses dados epidemiológicos sejam subestimados, dada a existência de portadores assintomáticos (Yoder et al. 2007).

A cada ano, cerca de 500.000 novos casos de giardíase são relatados, por isso, essa parasitose deve ser observada com especial cuidado, pois contribui de forma substancial para a geração de adultos com déficit no desenvolvimento físico e cognitivo (Bussatti et al. 2009).

Dos micro-organismos euariotos pertencentes ao reino Protista, os protozoários do gênero *Giardia* merecem considerável atenção devido à sua patogenicidade, especialmente em crianças e animais jovens (Thompson 2000, Koot et al. 2009).

A giardíase, infecção intestinal causada pela *Giardia lamblia* é uma das parasitoses mais comuns em todo o mundo, presente tanto em países desenvolvidos (CDC 2010) como naqueles em desenvolvimento (Dib et al. 2008). Estima-se que, por ano, ocorram cerca de 280 milhões de casos sintomáticos (Lane & Lloyd 2002, Alia & Hilla 2003) que, quando decorrentes em crianças, podem levar a déficits cognitivos e de crescimento graves (Niehaus et al. 2002, Berkman et al. 2003).

Na literatura, inquéritos epidemiológicos têm revelado que a *Giardia lamblia* é frequente, principalmente em crianças indicando transmissão zoonótica (Zaiden et al. 2008).

A recorrente presença de cães nas áreas urbanas expõe a população a contaminações ambientais e a doenças por meio do contato direto ou indireto com animais infectados, incluindo a giardíase e outras parasitoses (Katagiri 2007). Isso ocorre devido à defecação no ambiente e à contaminação da água de lençóis superficiais e freáticos, rios e lagos, oferecendo riscos à saúde pública e animal (Thompson 2004, Paulino 2005).

1.1 GIARDÍASE E EPIDEMIOLOGIA

A giardíase é um problema de saúde pública de distribuição mundial e é considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (Quihui et al. 2010, Robertson et al. 2010, Sadeghi & Borji 2015). Estima-se que cerca de 200 milhões de infecções ocorrem a cada ano na população mundial, sendo a maioria em crianças (Sadeghi & Borji 2015).

As variações ambientais micro e macroclimáticas têm impacto sobre a epidemiologia dessa parasitose intestinal visto que as mudanças climáticas, tais como o aumento da precipitação e da umidade e a diminuição da temperatura, são favoráveis à incidência da doença (Escobedo et al. 2015).

Nos países industrializados, a prevalência de parasitas intestinais tais como *G. lamblia* varia de 2% a 5%, enquanto que nos países em vias de desenvolvimento varia entre 20% a 40% (Meyer 1985; Ortega & Adam 1997; Ali & Hill 2003).

Em grande parte dos países desenvolvidos, a *G. lamblia* é um dos parasitos intestinais mais comumente identificados, alcançando taxas de prevalência entre 2-5% (Hörman et al 2004, CDC 2010), sendo a causa mais frequente de surtos epidêmicos de diarreia, relatados nos Estados Unidos (Baldursson & Karansis, 2011).

Estudos avaliando a ocorrência de giardíase em crianças de várias regiões do Brasil mostraram que na última década, a prevalência desta parasitose diminuiu, porém permanece elevada, variando de 4,7% a 27,5% (Carvalho-Costa et al 2007a, 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).

1.2 *Giardia lamblia*

Os protozoários são seres unicelulares que fazem parte do reino protista, sub-reino protozoa podendo ser ameboides (Thompson 2004), flagelados, ciliados e produtores de esporos (Elisabeth & Pegotti, 2010).

A *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) é um microrganismo eucariótico, unicelular e flagelado que parasita o intestino humano, assim como o de alguns outros mamíferos, incluindo cães, gatos, roedores, mas também alguns répteis e aves (Thompson, 2004). Esse parasito foi reconhecido pela primeira vez em 1681 por Van Leeuwenhoek, que descobriu esse patógeno em suas próprias fezes. O gênero *Giardia* foi nomeado por Kunstler, em 1882, quando verificou a presença de protozoários flagelados no intestino de girinos (Monis et al. 2009).

De acordo com a nomenclatura taxonômica mais antiga (Wade et al. 2000), o gênero *Giardia* pertence ao Filo Sarcomastigophora; Classe Zoomastigophorea; Ordem: Diplomonadida, Família: Hexamitidae e Gênero: *Giardia*; porém, de acordo com a nova

sistematização, com base em dados estruturais, bioquímicos e genéticos, o gênero *Giardia* pertence ao filo Metamonada, Subfilo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Trepomonadae, Subclasse Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (Plutzer et al. 2010).

O nome da espécie de *Giardia* é dependente da morfologia e do hospedeiro de origem. Estudos na literatura relatam que esse gênero possui seis espécies, das quais só uma delas é parasita de múltiplas espécies, denominada *G. lamblia*, *intestinalis* ou *duodenalis* (Adam 2001). No entanto, com o avanço das técnicas de biologia molecular foram identificados 11 diferentes genótipos de *G. lamblia*, dos quais oito foram encontrados no homem (Health Canada 2012).

Com base na morfologia dos parasitos, atualmente são reconhecidas apenas as espécies *Giardia muris* e *Giardia microti* parasitando roedores, *Giardia agilis* que infecta anfíbios, *Giardia psittaci*, parasito de periquitos, *Giardia ardea*, que infecta garças azuis e *Giardia lamblia* que infecta aves, a maioria dos mamíferos e é a responsável pela doença em humanos (Thompson et al. 2000, Plutzer et al. 2010).

A espécie *G. lamblia*, por sua vez, pode ser dividida em dois grupos, A e B (Feng & Xiao 2011). As diferenças genéticas relativamente grandes detectadas por sequenciamento genômico desses grupos sugerem que eles podem realmente ser duas espécies diferentes (Franzén et al. 2009).

A *G. lamblia* tem um genoma complexo (Adam 2001), sendo capaz de sofrer variação antigênica de proteínas de superfície durante o encistamento ou na infecção humana (Nash 2002, Touz et al. 2005). A variação antigênica parece estar associada a mecanismos de evasão desse parasita frente aos mecanismos imunológicos do

hospedeiro, porém o significado clínico dessa variação antigênica da *G. lamblia* ainda não foi totalmente elucidado.

1.2.1 Morfologia

A *G. lamblia* apresenta de duas formas: cistos e trofozoítos. Os cistos podem ser redondos ou elípticos, medindo de 12 a 15 μm de comprimento e 6-8 μm de largura. Eles contêm quatro núcleos, axonemas e um corpo mediano.

A parede cística é composta de uma camada exterior protofilamentosa e uma camada interna membranosa, formada, principalmente, por carboidratos (principalmente N-acetilgalactosamina) e proteínas, que lhe atribuem resistência e proteção às mais adversas alterações de ambiente e temperatura (Aguilar-Díaz et al. 2011).

O trofozoíto apresenta formato de gota, com simetria bilateral, medindo de 12-15 μm de comprimento, 5-9 μm de largura e 1-2 μm de espessura (Carranza & Lujan, 2010). Apresenta um citoesqueleto complexo, responsável pela conservação do formato do parasito e por ancorar os quatro pares de flagelos, emergentes do corpo celular em suas faces anterior, posterior, ventral e caudal (Elmendorf et al. 2003), responsáveis por conferir motilidade ao parasito (Ankarklev et al. 2010). Em sua face ventral, os trofozoítos apresentam uma estrutura denominada disco ventral, adesivo ou suctorial, que possibilita a adesão do parasito a diferentes estruturas, inclusive ao epitélio intestinal do hospedeiro (Palm et al. 2005) (Figura 1).

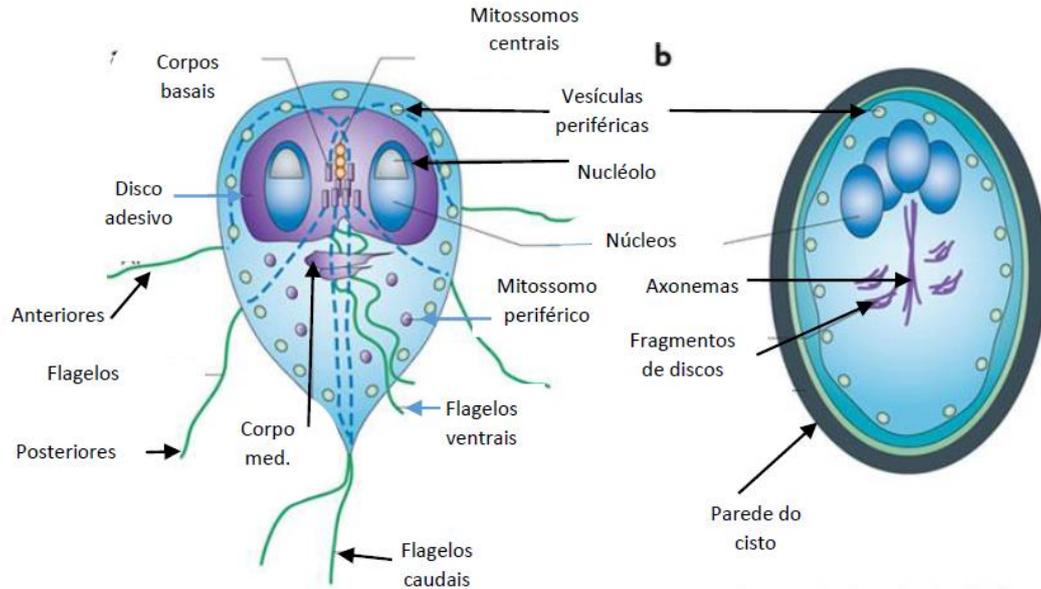


Figura 1 – Morfologia: do trofozoíto (a) e do cisto (b) de *Giardia lamblia*.

Adaptado de Ankarklev et al. 2010.

O disco ventral está ligado à membrana plasmática por microfibrilas compostas por α e β -tubulina, proteínas contráteis e proteínas do citoesqueleto denominadas giardinas (Palm et al. 2005). Uma vez que os protozoários do gênero *Giardia* sp. não invadem os tecidos do hospedeiro, o estabelecimento da doença depende em grande parte, da capacidade do trofozoíto em aderir ao epitélio intestinal, por isso, o disco ventral é uma organela de suma importância neste processo (Carranza & Lujan, 2010).

1.2.2 Ciclo biológico e transmissão

A *G. lamblia* possui um ciclo de vida simples, no qual se alterna entre duas formas biológicas e morfológicamente distintas: trofozoítos flagelados que causam a patologia pela colonização do intestino delgado, e os cistos que são resistentes ao

ambiente e altamente infecciosos (Eckmann et al. 2000; Prucca & Lujan 2009; Ankarklev 2010) (Figura 2).

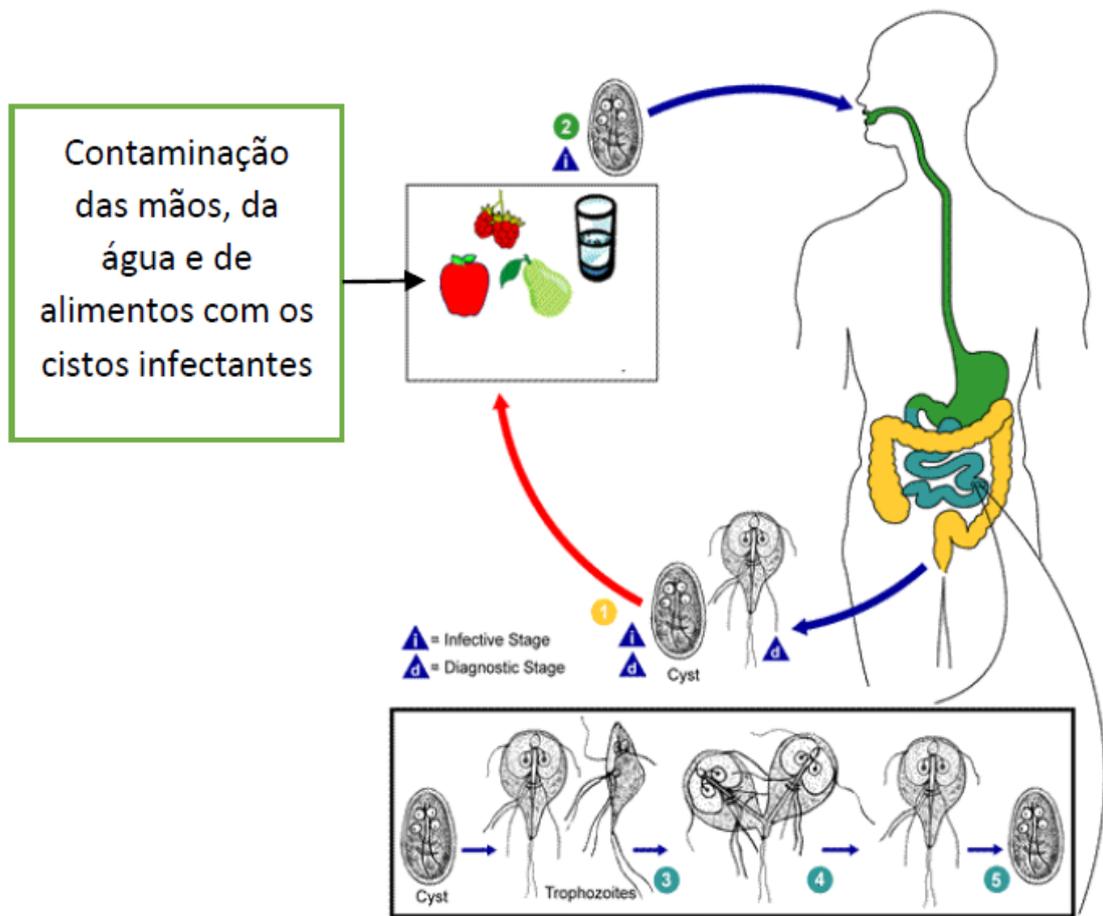


Figura 2 - Ciclo de vida da giardia e transmissão

Fonte: Disponível em: <<https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Giardiasis/lifecycle.htm>>. Acesso em: 10/12/2014

A transmissão do protozoário ocorre via fecal-oral, pela ingestão água e alimentos contaminados (frutas e verduras) apresentando cistos do parasito (Shahnazi & Jafari-Sabet 2010; Srisuphanunt et al. 2010).

Esses cistos podem permanecer viáveis no meio ambiente durante até três meses, sob condições favoráveis de temperatura e de umidade. Três aspectos são

importantes no contexto epidemiológico da doença: a resistência dos cistos no meio ambiente, a quantidade de cistos eliminados pelos pacientes, e o aspecto zoonótico da doença (Hunter & Thompson 2005).

O encistamento é uma adaptação para sobreviver fora do hospedeiro, de forma que o parasita se dobra sobre si mesmo e forma uma camada protetora ao redor das estruturas internas e dos flagelos, tornando-se apto para passar através do organismo do hospedeiro e chegar ao meio ambiente. A transformação do trofozoíto em cisto ocorrerá quando o ambiente interno se alterar ou o hospedeiro estiver sob condições de estresse (Hausen et al. 2006, DuBois et al. 2008, Midlej & Benchimol 2009).

Quando o parasita encistado atinge o ambiente alcalino do intestino delgado, o mesmo é exposto às enzimas digestivas e sais biliares, o que permite completar o processo de desencistamento. Os trofozoítos resultantes emergem de cada cisto e aderem-se aos enterócitos pelo disco adesivo ventral, iniciam a alimentação e estabelecem a infecção (Gallego et al. 2007).

Advertindo que, nos últimos anos, a transmissão direta, pelo contato pessoa-pessoa, tem adquirido grande importância, tornando-se muito comum, principalmente entre indivíduos institucionalizados, quando as condições sanitárias e de higiene são inadequadas (Abe & Teramoto 2012).

Também a transmissão sexual entre homens homossexuais vem sendo verificada em nações desenvolvidas, como em muitos países da Europa e nos Estados Unidos da América, onde a giardíase já é reconhecida como doença sexualmente transmissível (Shelton 2004).

1.3 PATOGÊNESE

Infecções parasitárias são mais comuns em crianças do que em adultos, e são uma das principais causas de desnutrição. É um ponto de preocupação, porque a desnutrição em crianças pode comprometer as suas capacidades de aprendizagem em seus anos de formação (Katona & Katona 2008).

As infecções por helmintos em crianças em idade escolar estão associadas com déficits cognitivos (Stoltzfus et al. 2011). Várias infecções por vermes, incluindo ancilostomíase, esquistossomose e giardíases, estão associados a anemia por deficiência de ferro e uma perda significativa de micronutrientes. A perda de sangue pode ser tão elevada quanto 45 ml/dia, ou o equivalente a 9,9 mg de ferro (Stoltzfus et al. 1997).

As manifestações clínicas da giardíase podem variar de portador assintomático até um estado de diarreia e má absorção de longa duração (Robertson et al. 2010), caracterizado por dores abdominais, diarreia, flatulência, esteatorreia, síndrome de má absorção, baixo crescimento e perda de peso, principalmente em crianças (Etthas, Danyani & Nemat 2010).

Alguns estados imunológicos parecem predispor à infecção por *G. lamblia*. De fato, indivíduos deficientes de anticorpos parecem ter uma maior incidência de giardíase e apresentam sintomatologia mais grave, particularmente os que têm défices de produção de Imunoglobulina A (IgA) (Faubert 2000, Langford et al. 2002).

A patogênese pode ser considerada como um processo multifatorial, envolvendo tanto as características do parasita quanto a resposta imune do hospedeiro (Geurden & Olson 2011).

Na infecção por *G. lamblia*, ocorre a formação de uma barreira mecânica impedindo a absorção de vitaminas, ácido fólico, ácidos graxos e ferro, levando esses pacientes a apresentarem anemia (Mansbach 2009), o que também pode causar diarreia aguda ou crônica, desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert 2000, Buret et al. 2002, Mueller 2005, Hausen et al. 2006; Gascón 2006).

A variação nas manifestações clínicas procede de causas multifatoriais, envolvendo tanto fatores relacionados ao hospedeiro, como ao parasito (Cotton et al. 2011). Recentemente, foi proposto ainda, que a gravidade de anormalidades pode diferir inclusive, conforme as regiões geográficas, apresentando-se diferentemente nos países em desenvolvimento ou desenvolvidos (Hollm-Delgado et al., 2008, Ward 2009, Siwila et al. 2010).

Efeitos deletérios da giardíase sobre o crescimento e desenvolvimento foram observados em crianças (Almerie et al. 2008, Nematian et al. 2008, Quihui et al. 2010). A desnutrição é frequentemente observada em crianças positivas para *G. lamblia* (Behera et al. 2008, Silva et al. 2009). Um estudo de caso-controle com crianças com giardíase revelou que houve diminuição do peso corporal, dos níveis séricos de ferro, de zinco (Abou-Shady et al. 2011). Má absorção de nutrientes foi relatada em pelo menos 50% dos pacientes com giardíase sintomática (Simsek et al. 2004; Celiksöz et al. 2005; Behera et al. 2008).

As principais anomalias estruturais e funcionais associadas à giardíase são encontradas no intestino delgado. A infecção humana pode conduzir a um espectro de alterações microscópicas que vão desde anormalidades suaves a atrofia das vilosidades em casos mais graves. Mesmo na ausência de mudanças na arquitetura das vilosidades e criptas, o encurtamento e interrupção das microvilosidades foram relatados sendo

associada, especialmente, à deficiência da enzima lactase (Buret et al. 1991, Singh et al. 2000). Todavia, em estudo utilizando cortes histológicos não foram observadas alterações patológicas em 96% dos indivíduos com giardíase (Oberhuber et al. 1997)

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A infecção por *G. lamblia* produz imunidade, embora não esteja esclarecido se a infecção prévia pelo parasito realmente evita uma segunda infecção ou apenas evita os sintomas severos da doença (Solaymani-Mohammadi & Singer 2010). Sabe-se que os sintomas da giardíase na reinfecção são de menor gravidade, o que reforça a hipótese de que a exposição anterior não impede a infecção, mas reduz a gravidade da doença (Kohli et al. 2008).

A infecção por *G. lamblia* é, na maioria das vezes, autolimitada, indicando a presença de uma defesa eficaz do hospedeiro (Eckmann 2003). Os mediadores imunes parecem agir localmente no lúmen, uma vez que *G. lamblia* não invade a camada epitelial, e provoca apenas uma ligeira inflamação das mucosas (Oberhuber et al. 1997). A imunoglobulina A tipo secretória (sIgA) desempenha um papel central na eliminação do parasita (Eckmann 2003, Langford et al. 2002), juntamente com mastócitos (Chin et al. 2002, Li et al. 2004) defensinas (Aley et al. 1994) e outros fatores do hospedeiro (Eckmann et al. 2000). Anticorpos IgG, IgM, IgA anti-*Giardia* têm sido detectados no soro de indivíduos com giardíase, em diferentes regiões do mundo. Além dos anticorpos circulantes, estudos têm relacionado a participação de IgA secretória na imunidade local a nível de mucosa intestinal. A função exata de IgA na resposta imune local ainda não é bem conhecida, mas evidências sugerem que este anticorpo

diminua a capacidade de adesão dos trofozoítos à superfície das células do epitélio intestinal (Neves et al. 2005).

A gravidade da doença depende dos fatores de virulência do parasito bem como do nível nutricional, imunológico e de desenvolvimento do hospedeiro (Chin et al. 2002, Scott et al. 2002). Alguns estados imunológicos parecem predispor à infecção por *G. lamblia*. De fato, indivíduos deficientes de anticorpos parecem ter uma maior incidência de giardíase e apresentam sintomatologia mais grave, particularmente os que têm défices de produção de Imunoglobulina A (IgA) (Faubert 2000, Langford et al. 2002).

Vários mecanismos de defesa têm sido propostos para eliminar a infecção por *G. lamblia*, incluindo produção de óxido nítrico e mucinas pelas células epiteliais, recrutamento e ativação de mastócitos e fagocitose por macrófagos (Solaymani-Mohammadi 2010).

Embora os sintomas associados com a infecção por *G. lamblia* têm sido bem documentados, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes que conduzem a doença não estão bem compreendidos. As células epiteliais expostas ao parasito exibem aumento da expressão de genes de resposta ao stress, diminuição da expressão proliferativa do gene (Roxström-Lindquist et al. 2005), rearranjo da actina (Teoh et al. 2000), ruptura de junções firmes (Troeger et al. 2007) aumento da permeabilidade intestinal (Panaro et al. 2007, Troeger et al. 2007) e a apoptose (Panaro et al. 2007, Chin et al. 2002). Além disso, quando expostas ao parasita *in vitro*, as células epiteliais secretam citocinas que são quimiotáticas para células do sistema imune, incluindo os macrófagos (Roxström-Lindquist et al. 2005).

A interação parasito-hospedeiro leva a sobre-regulação de genes envolvidos na cascata apoptótica e na formação de espécies reativas de oxigênio dentro das células

intestinais. Os resultados de alguns estudos indicam um novo mecanismo biológico no qual a ativação de um transportador ativo de glicose dependente de sódio (SGLT-1) possa impedir a apoptose dos enterócitos por aumentar a absorção de glicose. Esta resposta celular pode ser um mecanismo de defesa não específico do hospedeiro por aumentar a sobrevivência celular contra enteropatógenos, como a *Giardia* spp (Escobedo et al. 2008, Scorza & Lappin 2012).

O recrutamento de macrófagos para o local da infecção sugere que essas células tenham uma função de controle durante a infecção pelo parasito. Camundongos infectados com *Giardia muris* apresentam diminuição do recrutamento de células inflamatórias para a cavidade peritoneal e os macrófagos isolados reduzem a capacidade de resposta quimiotática (Belosevic & Faubert 1986) mas mantêm a capacidade de fagocitar trofozoítos (Owen et al. 1981, Hill & Pearson 1987, Belosevic & Daniels 1992). No entanto, em giardíase humana, não está claro como macrófagos respondem às citocinas secretadas a partir de células epiteliais durante a infecção e, subsequentemente, modulam a resposta imune do hospedeiro.

A estimulação celular pode ser observada pela ativação do metabolismo oxidativo com liberação de radicais livres. Os efeitos benéficos dos radicais livres no organismo humano parecem ser a participação nos processos de fagocitose e atividade microbicida, que visam eliminar os agentes potencialmente patogênicos (Olszewer 1995).

1.5 IMUNOMODULAÇÃO E ATIVIDADE FUNCIONAL DE FAGÓCITOS

A imunomodulação é um processo que pode alterar o sistema imune de um organismo interferindo em suas funções, levando ao aumento ou à diminuição das reações imunológicas. Quando estimula de componentes do sistema imunológico, ou seja, granulócitos, macrófagos, sistema complemento, linfócitos T, linfócitos B e diferentes substâncias efectoras é denominada de imunoestimulação. A Imunossupressão implica principalmente a redução da resistência para infecções, estresse e pode ocorrer por conta de fatores ambientais ou quimioterápicos (Makare et al. 2001).

Os imunomoduladores são aquelas substâncias capazes de ativar ou suprimir respostas imunológicas. A origem dos imunomoduladores é muito variada, podendo ser endógena ou exógena, tais como: como produtos microbianos, substâncias sintéticas e plantas medicinais (Farthing 1997, Blecha 2001, Reinaque et al. 2012, França et al. 2014), podem ser anticorpos (Honório-França et al 2001, França et al. 2011), hormônios (Fagundes et al. 2012, Hara et al. 2013, Morceli et al. 2013, Honório-França et al. 2013) e citocinas (Fagundes et al. 2013).

A atividade imunomoduladora de uma substância pode ser avaliada verificando a sua atuação na atividade de fagócitos (Velloso et al. 2007). Os macrófagos e neutrófilos são as células do sistema imune envolvidas no processo de fagocitose. A fagocitose é um dos principais mecanismos de destruição de microrganismos e se inicia com a aderência destes à membrana celular. Essa interação pode ser potencializada por fatores hormonais e imunológicos (Honório-França 2001; França et al. 2011; França et al. 2012, França-Botelho et al. 2012, Morceli et al. 2013, Honório-França et al. 2013).

Após a fagocitose, a destruição de micro-organismos pode ser mediada por

dois mecanismos: metabolismo oxidativo, com produção de metabólitos ativos do oxigênio (Honorio-França et.al. 1997, França et.al. 2011-a, França et. al. 2011-b), e liberação de enzimas lisossômicas (Segal & Soothill 1983). A função das espécies reativas de oxigênio gerado durante o metabolismo celular tem sido bastante estudada. Esses componentes reativos, gerados pela consecutiva redução univalente da molécula de oxigênio (Asad et al. 1994), participam de processos imunológicos, na peroxidação de lipídeos, nas alterações em DNA, em reações inflamatórias (Ames et al. 1993), modificam os eventos de fosforilação durante o metabolismo oxidativo e os níveis intracelulares de Ca_2^+ (Carrichon et al. 2011).

O papel dos radicais livres é um fenômeno extremamente importante durante as respostas imunológicas e reações inflamatórias, ao passo que a atividade microbicida dos fagócitos tem sido associada à ativação do metabolismo oxidativo celular e à liberação de grandes quantidades de radicais livres (Dizdaroglu et al. 2002).

Poucos estudos têm avaliado a interação da *G. lamblia* com fagócitos. Sabe-se que essas células, quando em presença de *G. lamblia* opsonizadas por anticorpos, são capazes de fagocitar e eliminar esses micro-organismos (França-Botelho et al. 2006). Portanto, a fagocitose desempenha um papel importante na patogenicidade da *G. lamblia*, tornando-se objeto de investigações.

1.6 DIAGNÓSTICO

1.6.1 Clínico

As infecções sintomáticas ocorrem em cerca de 20 a 80% das pessoas com amostras de fezes positivas e são caracterizadas por náuseas, vômitos, dores epigástricas, e diarreia (Wolfe 1984, Flanagan 1992, Farthing 1997, Eckmann 2003, Thompson et al. 1993). Esses sintomas estão associados a má absorção de nutrientes e podem levar a perda de peso e à desnutrição em crianças, expondo esse grupo vulnerável a falhas e problemas de desenvolvimento (Solaymani-Mohammadi & Singer 2010).

A infecção por *G. lamblia* causa a formação de uma barreira mecânica impedindo a absorção de vitaminas, ácido fólico, ácidos graxos e ferro, levando esses pacientes a apresentarem anemia (Mansbach 2009).

A doença se cura espontaneamente na maior parte dos casos, embora a fase aguda da doença possa evoluir para doença crônica, mesmo em indivíduos imunocompetentes (Robertson et al. 2010). Nesses casos, os sintomas da doença reaparecerão por períodos curtos e recorrentes (Wolfe 1984, Flanagan 1992, Adam 2001).

1.6.2 Laboratorial

A forma clássica de diagnóstico da giardíase é o exame parasitológico de fezes, com pesquisa de trofozoítos em fezes líquidas e cistos em fezes pastosas (Machado et al. 2001, Cimerman 2002, Souza et al. 2003). Como a eliminação de cistos nas fezes não é contínua, o diagnóstico imunológico representa grande importância na detecção da giardíase. Testes como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta

mostram alta sensibilidade e especificidade, porém, devido ao alto custo, não têm sido muito utilizados no Brasil.

O aperfeiçoamento da técnica citometria de fluxo para detectar *G. lamblia* permitiu também a quantificação morfo-funcional de micro-organismos individuais (Barbosa et al. 2008). Vários estudos demonstram a eficiência das provas sorológicas para pesquisa de *Giardia lamblia* (Uecker et al. 2007).

Estudo de técnicas de imunoseparação magnética acoplada à imunofluorescência, em relação ao método de Faust e de Lutz, comprovaram maior sensibilidade da primeira em relação às outras (Souza et al. 2003). A imunoseparação magnética acoplada à imunofluorescência apresenta como vantagem proporcionar o processamento de várias amostras simultaneamente, além de aumentar a recuperação de cistos de *G. lamblia* e reduzir o tempo de estocagem das amostras.

Análises comparativas entre as técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA para pesquisa de IgG anti-*Giardia* comprovaram ter a imunofluorescência indireta maior concordância com o resultado do Exame Parasitológico de Fezes (EPF) (Guimarães & Sogayar 2002).

Estudo comparando métodos laboratoriais para diagnóstico da giardíase, tais como: o método direto com coloração por lugol, a técnica de hematoxilina férrica, o método de concentração de Faust e coproantígeno (em microplaca ProSpect Giardia®) revelaram que hematoxilina e o método direto apresentaram menor positividade, enquanto que o método de Faust e coproantígeno foram mais efetivos para diagnóstico. O ensaio imunoenzimático parece melhorar na qualidade da detecção desse parasito (Machado et al. 2001).

1.7 TRATAMENTO

Uma variedade de agentes quimioterapêuticos têm sido utilizados no tratamento da giardíase. No entanto, a maior parte dos fármacos utilizados exibem efeitos secundários significativos e são contra-indicados em alguns casos. Além disso, a *G. lamblia* é capaz de desenvolver resistência a esses agentes (Wright et al. 2003, Muller et al. 2000).

O metronidazol (1- β -hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazole) é a droga mais utilizada para o tratamento de infecções causadas por *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, e *Blastocystis* spp. (Upcroft e Upcroft 2001, Busatti et al. 2009, Leitsch et al. 2011, Mirza et al. 2011). Em todos esses parasitos foram documentados casos de sintomas recorrentes e resistência (Upcroft et al. 2006, Bansal et al. 2006, Tejman-Yarden et al. 2011), incentivando o avanço da pesquisa sobre drogas alternativas contra estes parasitos.

Têm sido relatados alguns casos de falhas terapêuticas de *G. lamblia* ao Metronidazol e a busca de novos fármacos para o tratamento específico de protozoários intestinais ainda são objetos de estudos (Ouattara et al. 2010).

1.8 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE FÁRMACOS

Por definição, sistema de liberação modificada de fármaco é um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos. Desta forma, alterações cíclicas na concentração são eliminadas e a disponibilidade

biológica do fármaco é aumentada. Também, pode ser conseguida redução da toxicidade, supressão de reações adversas e diminuição do número de doses administradas, diariamente (Kalachandra et al. 2006, Kockisch 2005).

Estudos mostram que a forma farmacêutica em que são veiculados os fármacos é de grande importância e tem responsabilidade pelos efeitos terapêuticos dos medicamentos, em razão de poderem modificar favoravelmente ou não, a biodisponibilidade deles (Ribeiro 2013).

Observou-se que substâncias farmacologicamente ativas, quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, não controlam a liberação e podem não atingir concentração apreciável no tecido alvo em virtude de uma série de barreiras biológicas, entre elas, a motilidade gastrointestinal, o pH intraluminal, o fluxo sanguíneo e a ação enzimática influenciam a absorção gastrointestinal de medicamento (Wu & Benet 2005, Pestana et al. 2008).

Sistema de liberação controlada é um sistema onde o fármaco libera-se de forma mediada, e com um tempo pré-fixado (figura 3). Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, sendo mais eficaz do que as formas convencionais. O nível terapêutico descreve um platô ao longo do tempo na dose terapêutica que diminui lentamente (Lin, 2003, Kockisch et al. 2005, Escobedo et al. 2008, Talegaonkar et al. 2008) evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos.



Figura 3 - Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.

Fonte: Ghandehari (2003).

Nos últimos anos, a procura por novos sistemas de liberação modificada de fármacos tem sido relevante no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar moléculas biologicamente ativas em local específico, com nível terapêutico relevante e efeitos colaterais mínimos (Lawrence & Rees 2000).

Nesse contexto, destacam-se as microemulsões (ME), como uma forma farmacêutica interessante para veiculação de moléculas com atividade terapêutica (Oliveira et al. 2004).

As MEs (microemulsões) diferem das emulsões simples, que são dispersões grosseiras bifásicas, turvas e termodinamicamente instáveis com gotículas de 2000 a 10000 nm de diâmetro, pelo fato de apresentarem tensão interfacial bem menor, já que as moléculas do co-tensioativo se intercalam entre as moléculas do tensioativo na interface

óleo-água afetando a curvatura da gotícula (Gradzielski 2008). Esta baixa tensão interfacial promove a formação de sistemas monofásicos e a formação de gotículas de tamanho reduzido termodinamicamente estáveis (Fanun 2012).

A interface biomateriais-fármacos tem sido utilizada em diferentes áreas da saúde para o desenvolvimento de sistemas de liberação e tratamento de patologias (Faraji & Wipf 2009). Baseado nos benefícios da utilização desses novos sistemas de liberação para modulação do sistema imune, a literatura descreve a utilização comercial de um carreador microemulsionado para melhorar o potencial imunossupressivo da Rapamicina e o uso de microemulsão para veiculação de melatonina oral como imunoestimulante e modulador (Lawrence & Rees 2000, Talegaonkar et al. 2008).

A ME é definida como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água. A sua formulação geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito (Rosano 1974, Aboofazeli et al. 1994, Constantinides & Yiv 1995, Ho & Sheu 1996, Bagwe et al. 2001, Oliveira et al. 2004, Nornoo et al. 2009).

Assim, as microemulsões possuem características que as tornam ideais como candidatas à formulação de drogas pouco solúveis em água e baixa permeabilidade, a ser administrada por via oral (Nornoo et al. 2009). Quando bem caracterizada, a utilização desses veículos é uma alternativa viável para o controle de liberação de estímulos que modulam o sistema imunológico (Sajan et al. 2009, Mandal et al. 2010). O controle de liberação é importante, pois a imunomodulação deve ser controlada a fim de proteger o

organismo da resposta pró-inflamatória excessiva e, ao mesmo tempo, produzir respostas imunes eficazes (Riet et al. 2007).

Para a caracterização adequada destes sistemas, são empregadas técnicas experimentais como pH, condutividade elétrica, caracterização reológica, difração de raio X, dentre outras técnicas (Podlogar et al. 2004, Boonme et al. 2006). Muitos estudos têm agregado valor com o estudo físico de equilíbrio hidrófilo-lipófilo e de diagramas pseudoternários como forma de propor novos veículos, baseando-se nas concentrações de mistura entre óleo, água e tensoativos (Kreilgaard 2002).

Trabalho recente produziu e caracterizou um sistema microemulsionado com levamisol incorporado que foi capaz de estimular a fagocitose e a atividade anti-parasitária de fagócitos para *Entamoeba histolytica* (Ribeiro et al. 2015). Esses resultados sugerem que esse sistema de liberação microemulsionado com levamisol pode representar um possível neomaterial como alternativa para terapias de parasito ou como agente imunomoduladora.

O cloridrato de levamisol, 1-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazol[2,1-b]tiazol-cloridrato, é um anti-helmíntico eficiente e de amplo espectro para o tratamento de nematóides gastrointestinais em seres humanos e em animais e é utilizado na dose de 5-40 mg kg⁻¹, dependendo da espécie de parasitas envolvidos (Amery & Bruynseels 1992).

Além das propriedades anti-helmínticas, o levamisol pode atuar na imunoestimulação (Stogaus & King 1995). Vários trabalhos têm buscado demonstrar que diferentes parâmetros imunológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* podem ser modulados pelo levamisol (Connell et al. 2006, Holcombe et al. 2006, Zhang & Que 2008, Bisalla et al. 2009, Sayad et al. 2012).

Outros estudos comprovaram ainda que ele tem a propriedade de estimular a atividade das células T e aumentar a função dos linfócitos B (Janik et al. 1993, Deniz Ayli et al. 2000, Connell et al. 2006), de fagócitos (Ribeiro et al. 2015) e parece atuar como adjuvantes para vacinas (Alavian & Tabatabaei 2010). Vários estudos demonstram o potencial imunoestimulador do levamisol com capacidade de controle de diversas infecções, incluindo parasitoses (Holcombe et al. 2006, Bisalla et al. 2009). Porém seus efeitos, quando incorporados a microemulsões, ainda não foram elucidados.

É possível que esse fármaco, quando incorporado à microemulsão, possa atuar funcionalmente sobre fagócitos e ativar os mecanismos intracelulares durante interações dessas células com *G. lamblia*. Assim, compreender os efeitos da microemulsão de levamisol sobre as células do hospedeiro na presença do parasito, bem como a sinalização intracelular que ocorre durante a infecção pelo parasito, são necessários para definir um modelo funcional dos mecanismos de fagocitose em humanos durante a infecção por *G. lamblia*.

2 JUSTIFICATIVA

G. lamblia é mundialmente considerado o protozoário mais comum que parasita o intestino humano e sua disseminação está associada a condições sanitárias. Em algumas regiões do Brasil, a prevalência de giardíase é de 20%, sendo mais comum em crianças devido ao modo direto de transmissão (Pereira et al. 2007, Tashima et al. 2009).

Entretanto, o tratamento da giardíase depende de terapia de droga antimicrobiana (Gardner & Hill 2001), sendo que, em 20% dos casos, ocorre resistência cruzada entre antimicrobianos ou falhas no tratamento (Escobedo et al. 2008, Upcroft & Upcroft 2001, Tejman-Yarden et al. 2011).

Embora a literatura tenha reportado falhas terapêuticas de *G. lamblia* às drogas utilizadas, a busca de novos fármacos para o tratamento específico de protozoários intestinais ainda é um desafio (Ouattara et al. 2010).

Trabalho recente do grupo tem produzido e caracterizado um sistema microemulsionado com levamisol incorporado que foi capaz de estimular a fagocitose e a atividade anti-parasitária de fagócitos para *Escherichia coli* enteropatogênica (Pessoa et al. 2015) *Entamoeba histolytica* (Ribeiro et al. 2015), porém seus efeitos para a *Giardia* ainda não foram elucidados.

Sabe-se que o levamisol tem a capacidade de estimular a atividade das células T e linfócitos B e parece atuar como adjuvantes para vacinas potencializando a resposta imunológica do hospedeiro e atividade microbicida nas diversas infecções, incluindo parasitoses.

Assim, trabalhos que busquem compreender os mecanismos de imunomodulação sobre a atividade funcional dos fagócitos, são importantes para compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na infecção por *G. lamblia*, que acomete a população brasileira, sobretudo na região da Amazônia Legal, onde as condições socioeconômicas e sanitárias são muito precárias.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de microemulsão incorporada com levamisol *in vitro* como modulador da atividade funcional de fagócitos do sangue humano, na presença de *G. lamblia*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos este trabalho pretendeu realizar a preparação do sistema microemulsionado incorporado de levamisol (*6MELe*) e analisar:

- a fagocitose de células do sangue na presença do sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol e da *G. lamblia*;
- a atividade anti-parasitária dos fagócitos do sangue na presença do sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol para *G. lamblia*;
- os efeitos imunomoduladores do sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol sobre a liberação de Ca^{2+} intracelular pelos fagócitos;
- a indução de apoptose na interação entre fagócitos do sangue periférico e *G. lamblia*.

4 METODOLOGIA

4.1 COMPOSIÇÃO DO SISTEMA

A microemulsão incorporada com Levamisol (MELe) foi formulada de acordo com Ribeiro et al. (2015). Foram utilizados para composição do sistema água destilada, Triglicérides de ácido cáprico/caprílico - Polymol 812®, EHL= 10,8 (Emfal®, Betim, Brasil), Oletado de sorbitano - Span 80® (SP), EHL = 4,3 (Emfal®, Betim, Brasil), Polissorbato 80 - Tween 80® (TW) - EHL = 15,0 (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil) e 1-butanol (BT), (Vetec®, Rio de Janeiro, Brasil), sendo o sistema denominado SP/TW/BT. A substância química de referência utilizada foi o Cloridrato de Levamisol (Henrifarma®, São Paulo, Brasil) com teor declarado de 99,0 %.

4.1.1 Desenvolvimento dos sistemas microemulsionados

Para o desenvolvimento do sistema, foram utilizadas quantidades pré-estabelecidas dos componentes, e cada componente variou de 20 a 80 %. As amostras foram classificadas visualmente, após 72 horas a 25°C, em regiões de Microemulsão líquida (MEL), Emulsão gel (EG) e Separação de Fases (SF).

Foram realizadas titulações aquosas de razões de massa de mistura de tensoativos/fase oleosa de 1:9 a 9:1 sob agitação, com o intuito de se obter pontos delimitantes, a área e a classificação das diferentes regiões de formação dos sistemas no diagrama. A titulação foi realizada com acréscimos de água destilada em quantidade de 0,05 mL a 0,2 mL, sendo que, durante o processo, as misturas passaram por agitação

mecânica e manual. Após a homogeneização de cada volume do titulante, as formulações foram classificadas visualmente.

4.1.2 Construção de diagramas de fases pseudoternários

A partir dos dados das amostras e das titulações realizadas, foram construídos os diagramas pseudoternários por meio do programa SigmaPlot 8.0, onde no diagrama o vértice superior representa 100 % de tensoativo/co-tensoativos, o inferior direito 100 % de fase oleosa e o inferior esquerdo 100 % de fase aquosa.

4.1.3 Seleção dos sistemas microemulsionados

De posse da determinação das regiões de domínios no diagrama pseudoternário, pode-se determinar a concentração dos sistemas que se enquadram na região de MEL. Nessa região, foram pré-selecionados pontos distribuídos em retas que cortam o seguimento da região de forma a se conseguir amostras representativas dos sistemas em estudo, sendo esses sistemas caracterizados em testes posteriores.

4.1.4 Estudo de densidade aparente

A densidade aparente corresponde ao volume ocupado pela substância, sem a exclusão das porosidades. Sua determinação é necessária para calcular a capacidade volumétrica para formas farmacêuticas em cápsulas. A medição do volume aparente foi realizada em piconômetro de vidro com capacidade para 10 mL, seguido da pesagem em balança analítica. A densidade aparente média dos pontos do sistema e da formulação escolhida foi determinada segundo a equação:

$$dap = m / v$$

Onde: Densidade aparente (dap), massa (m) e volume (v).

4.1.5 Preparo das formulações

Em função da média da densidade aparente dos pontos do sistema, cloridrato de Levamisol foi dissolvido no peso equivalente de fase aquosa da microemulsão formulada na concentração de $8,47 \times 10^{-2}$ g/mL, sob agitação, seguido de adição das fases de tensoativo e oleosa, respectivamente. Dessa forma, o Levamisol foi solubilizado para fornecer a proporção de 80 mg no volume de 95 mL de microemulsão, sendo o sistema denominado microemulsão levamisol (MELe).

4.1.6 Tamanho das partículas do sistema microemulsionado

Suspensões coloidais da formulação MELe foram preparadas por análises usando a técnica DSL (Dispersão de luz dinâmica) Trata-se de uma técnica para medir o tamanho e distribuição de tamanho de partículas e moléculas tipicamente na região do submicron, e com o tecnologia de ponta inferior a 1 nm. Dessa forma, foi possível averiguar o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta do sólido disperso. As amostras foram preparadas a partir de uma diluição de 1: 1000 da formulação em água desionizada em cuvetes de quartzo usando água deionizada como referência. As análises DLS foram obtidas de equipamentos Zetaizer Nano Z90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, United Kindom) com excitação 632,8 nm.

4.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

Foram coletadas 55 amostras de sangue periférico de doadores clinicamente sadios, do sexo masculino, com idade entre 18 a 35 anos. Essas amostras, aproximadamente 8 mL de sangue, foram coletadas em tubos contendo EDTA e imediatamente processadas.

Todos os doadores receberam orientações em relação aos fins de que a coleta seria destinada para um trabalho científico e assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

4.3 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

O sangue coletado foi centrifugado por 15 minutos a 160 x g. O plasma foi retirado e as células foram separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 160 x g, sob temperatura de 37°C. Após centrifugação o anel rico em fagócitos MN foi retirado. Os fagócitos MN foram contados em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/mL. As células foram utilizadas nos ensaios de imunofenotipagem, fagocitose, atividade anti-parasitária, apoptose e Ca^{2+} intracelular.

4.4 PARASITOS

Foram utilizados nos experimentos, trofozoítos de *G. lamblia*, Portland 1 (P1, ATCC 30.888). Os parasitos foram cultivados de modo axênico no meio TYI-S-33 modificado (Keister 1983), num período de 2 a 5 dias. Antes dos experimentos, os tubos contendo as culturas de trofozoítos de *G. lamblia* foram centrifugados a 250G durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente foram lavados e ressuspensos no meio de cultura 199 (França-Botelho et al. 2006). A capacidade de sobrevivência dos parasitos no meio 199 foi determinada pela incubação de 10^6 trofozoítas/mL de meio 199. Após duas horas de incubação, a mobilidade dos flagelos e o movimento do trofozoíto foram medidos para determinar a viabilidade do parasito (Hill & Pearson 1987).

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

G1. MNs + 25 μ L de meio de cultura 199 + *G. lamblia*

G2. MNs + 25 μ L de Levamisol (LE) $8,47 \times 10^{-2}$ g mL⁻¹ + *G. lamblia*

G3. MNs + 25 μ L de microemulsão (ME) + *G. lamblia*

G4. MNs + 25 μ L de MELe + *G. lamblia*

4.5.1. Tratamento dos fagócitos do sangue pelo sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol (MELe)

A incubação dos fagócitos com a microemulsão (MELe) foi realizada de acordo Ribeiro et al. (2015). Os fagócitos (2×10^6 cels/ml) foram incubados com 25 μ de MELe, por 30 min a 37° C. Para comparação, as suspensões de células e de parasitos foram incubadas, nas mesmas condições, com 25 μ L de uma solução de levamisol na concentração de $8,47 \times 10^{-2}$ g/mL. Os fagócitos foram lavados uma vez com meio de cultura 199, e imediatamente usados para análises. Um controle foi realizado usando somente meio de cultura. A seguir foram realizados os ensaios de fagocitose, atividade anti-parasitária e apoptose. Nos ensaios de liberação de cálcio intracelular foram utilizados os mesmos grupos, no entanto, sem os trofozoítos de *G. lamblia*, porque os mesmos inviabilizam a análise no citômetro de fluxo.

4.6 IMUNOFENOTIPAGEM

Células MN do sangue foram lavadas com Tampão Salina Tamponada (PBS) acrescido de BSA (Albumina Bovina Sérica) - Sigma- St Louis - USA por 10 minutos a

4° C. As células foram marcadas com 10µl de anti-CD14⁺ FITC, anti-CD3⁺ PerCP, anti CD4⁺ FITC, anti CD8⁺ PE e anti CD19⁺ FITC por 30 minutos sob refrigeração. As células MN foram lavadas e ressuspensas em PBS-BSA e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). O mínimo de 10.000 células foram avaliadas pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Os dados foram analisados por meio do software Flowjo 7.2.5.

4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade dos fagócitos do sangue periférico humano foi avaliada pela técnica de alaranjado de acridina (Bellinati-Pires et al., 1989). O Alaranjado de acridina é um corante fluorocromo vital, metacromático, que se liga ao DNA ou RNA celular (Frester, 1971; Smith e Rommel, 1977). Quando examinado sob um microscópio ultravioleta, em contato com DNA de cadeia dupla, emite cor verde, ortocromática e quando em contato com o DNA desnaturado ou despolarizado, ou RNA de cadeia simples, na forma metacromática, emite cor alaranjado ou avermelhado (Smith e Rommel 1977, Zelenin 1999, McFeters et al. 1991).

Após separar os fagócitos MN conforme protocolo de separação de células (sangue) e ajustado a concentração (2×10^6 células/mL), elas foram incubadas com o levamisol e com a microemulsão incorporada ou não com levamisol. As suspensões celulares (2×10^6 células/mL), mais o levamisol/ou microemulsão incorporada com levamisol foram incubadas por duas horas em banho-maria a 37°C. Decorrido o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 160 G). O sobrenadante foi então desprezado e o botão celular “pellet” foi corado com 200 µl de alaranjado de acridina (concentração 14,4 mg/mL) (Sigma, St Louis, USA-2mg/mL). Posteriormente

as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS sob centrifugação (10 minutos a 160 G). A seguir foram montadas laminais com 20 µL das células e analisadas em microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse E-200).

O índice de viabilidade celular foi obtido através da contagem de 100 células, onde foram contabilizadas as células vivas as que possuíam coloração verde e as células mortas as que possuíam coloração alaranjada, obtendo-se uma relação de células vivas/mortas (França et al 2011).

4.8 ENSAIO DE FAGOCITOSE E ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA

Foram misturadas as suspensões de células MN (2×10^6 células/mL), tratados ou não pela MLe e com os trofozoítas de *G. lamblia* (4×10^4 trofozoítos/mL), seguido de incubação por duas horas a 37° C. Após esse processo, as células foram separadas por centrifugação durante 10 minutos e coradas com 200µl de acridina orange por 2 minutos. Após esse procedimento, o sedimento foi ressuscitado em meio 199 gelado, lavado duas vezes e observados em microscópio de imunofluorescência (Nikon – Eclipse E200). Foram contados 100 parasitos por lâmina, o fluorocromo metacromático e acridina permite determinar a morte de leucócitos e *G. lamblia*.

O índice de fagocitose foi calculado pela contagem do número de células que fagocitaram *G. lamblia* em um total de 100 células. O índice microbicida foi obtido a partir da contagem de células contendo parasitos. Os parasitos fagocitados com a coloração laranja foram contados como mortos, e parasitos que englobadas pelos fagócitos, porém, encontravam-se na cor verde, foram considerados vivos (França et al. 2011). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.9 ENSAIO DE APOPTOSE

Para o ensaio de apoptose, foi utilizado o Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection. As células, microemulsão e trafozoítos foram previamente incubados de acordo com os protocolos descritos acima. Um controle positivo foi preparado utilizando-se suspensão de fagócitos mononucleares de sangue estimulados com estaurosporina (Sigma 100µg/mL), incubadas por um período de oito horas (Pundt et al., 2009) em estufa (37°C – 5% de CO₂). A seguir os fagócitos MN foram incubados por 10 min. à temperatura ambiente com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Depois desse período, a suspensão, células e trofozoítos, foram analisadas no fluorímetro (Fluoroskan/Science-Thermocientific).

4.10 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR PELOS FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

Para se verificar os mecanismos intracelulares de modulação de fagócitos pelo sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol, que ocorre na dependência de liberação de cálcio intracelular, foi utilizado o corante fluorescente Fluo-3 (Sigma). Suspensões de células de sangue foram pré-incubadas com as microemulsões, misturadas a 37 °C por 30 min, sob agitação contínua. A seguir foram centrifugadas duas vezes (1500 rpm, 10 min, 4° C) ressuspendidas em PBS contendo BSA (5 mg/mL) e incubadas com 5 µL de Fluo-3 (1 mg / mL) por 30 min a 37° C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo BSA (5 mg/mL; 1500 rpm, 10 min, 4° C) e analisadas por Citometria de Fluxo FACSCalibur (BD San Jose EUA). O Fluo-3 foi detectado utilizando-se filtro na faixa de 530/30nm. A quantificação da liberação de cálcio intracelular foi expressa como a média geométrica da intensidade de fluorescência do Fluo-3.

4.11 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Campus Araguaia da Universidade Federal de Mato Grosso, Parecer nº 1.018.274 (ANEXO 1). As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade do doador, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no trabalho. Os doadores foram previamente informados e o material somente foi coletado ou utilizado, sob exposto consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE) (ANEXO 2), conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP). Os experimentos foram realizados dentro de normas de biossegurança e cada tipo de ensaio *in vitro* foi realizado em duplicatas.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a viabilidade, fagocitose, atividade anti-parasitária, liberação de cálcio intracelular e apoptose, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. As estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0.05 ($P < 0.05$).

5 RESULTADOS

➤ A análise dos dados se dispõe sob a forma de figuras e tabela, apresentados na sequência abaixo:

➤ Preparação do sistema microemulsionado;

➤ Imunofenotipagem

➤ Viabilidade celular;

➤ Leucofagocitose

➤ Atividade anti-parasitária

➤ Apoptose

➤ Liberação de cálcio intracelular

5.1 PREPARAÇÃO DO SISTEMA MICROEMULSIONADO

Os diagramas de fases pseudoternário para classificação dos pontos e domínios de região estão apresentados na Figura 4. A mistura de tensoativos SP/TW/BT (3,5:5,5:1,0) associado ao Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico e à água destilada em proporções pré-estabelecidas pelo diagrama resultou em 36 pontos com características de equilíbrio divergentes. Observam-se que proporções acima de 45% de tensoativo promoveram pontos com equilíbrio termodinâmico em virtude do predomínio de sistemas homogêneos e translúcidos (Figura 4a).

A Figura 4b apresenta a delimitação das regiões de domínios no diagrama pseudoternário a partir do diagrama de pontos e das titulações. Pontos foram selecionados na região de microemulsão líquida para o estudo do sistema SP/TW/BT. Analisando o comportamento das fases, observa-se que o sistema de tensoativos promoveu amplas faixas de sistemas estáveis. Contudo, assim como no diagrama de pontos, os domínios de região abaixo de 40% de tensoativos demonstraram instabilidade e separação de fases (Figura 4b).

Das 36 formulações, somente a formulação *6MELe* foi estável em condições extremas e submetida à incorporação do fármaco. Sendo assim, essa formulação denominada *6MELe* foi utilizada nas avaliações de atividade celular frente ao parasito (Figura 5).

Os diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta foram obtidos na formulação do sistema microemulsionado MELe $20.98\text{nm} \pm 0.78$ e $- 2.22 \pm 0.92$, respectivamente (Figura 4c)

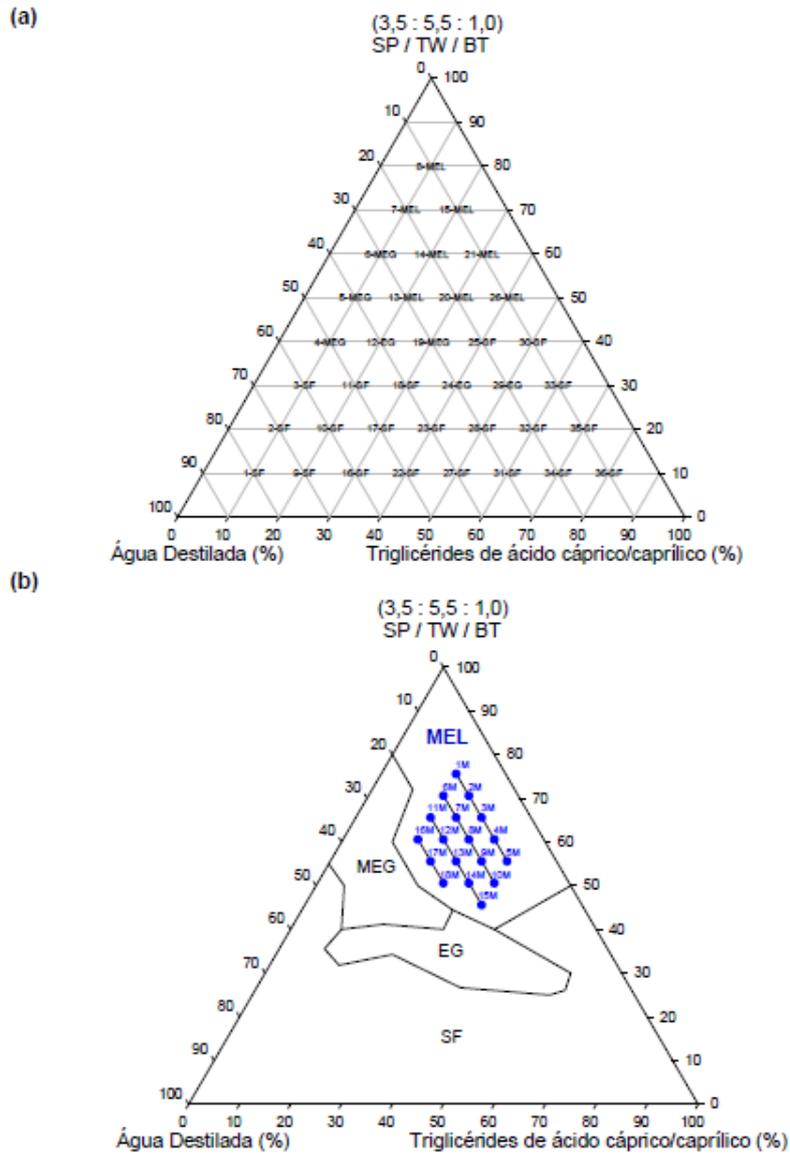


Figura 4 - Diagramas pseudoternário de classificação dos pontos (a) e de domínios de região com as microemulsões selecionadas (b) do sistema SP/TW/BT. *Microemulsão líquida (MEL), Microemulsão gel (MEG), Emulsão gel (EG), Separação de Fases (SF).

cu

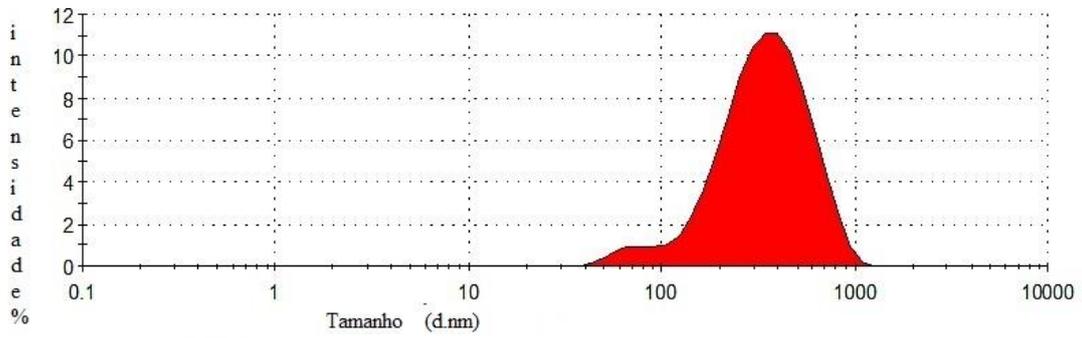


Figura 5a. Tamanho das partículas do sistema microemulsionado MELe



Figura 5b - Imagens das microemulsões selecionadas do sistema SP/TW/BT. (A) Microemulsão líquida (MEL); (B) Separação de Fases (SF), (C) Microemulsão Levamisol (MLe).

5.2. IMUNOFENOTIPAGEM

Na tabela 1 estão apresentados os percentuais de células do sangue humano expressando marcadores CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e CD19⁺. Observa-se que após o processo de separação celular houve expressão de marcadores CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD14⁺.

Tabela I. Imunofenotipagem de linhagens celulares do sangue periférico, caracterizando as células mononucleares.

Marcadores de superfície celular	Intensidade de Fluorescência
	Expressão (%)
CD 3	20,2± 1,2
CD 4	11,7 ±2.9
CD 8	5,51±0.9
CD14	15,8 ±2,5
CD19	7,4±0,8

5.3 ÍNDICE DE VIABILIDADE

A Figura 6 apresenta o índice de viabilidade (%) dos fagócitos MN. Observou-se que a viabilidade dos fagócitos MN foi menor quando incubado com microemulsão. A microemulsão incorporada com levamisol determinou índices de viabilidade celular similares aos encontrados quando a célula foi incubada em meio de cultura.

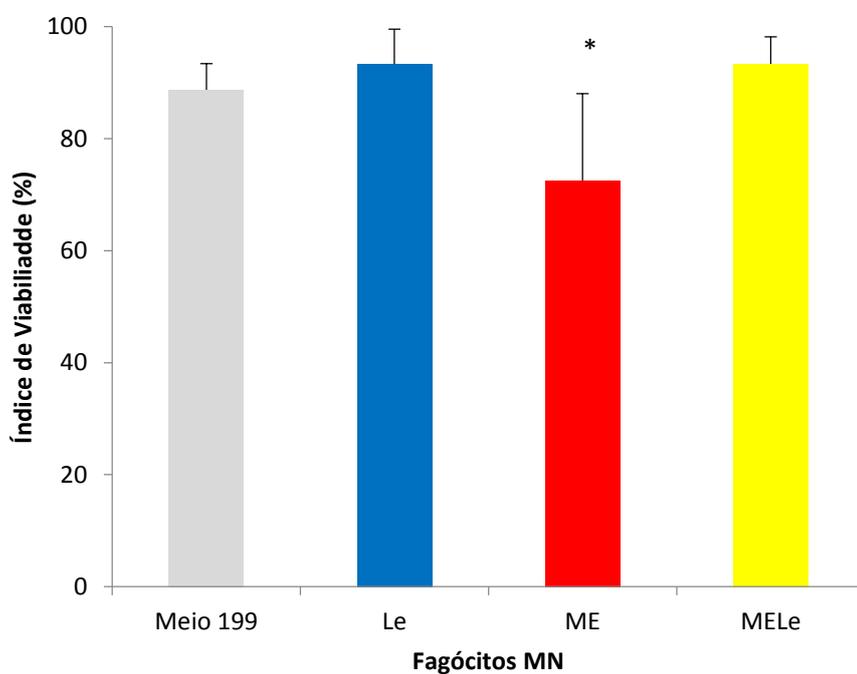


Figura 6 - Índice de viabilidade (%) dos fagócitos MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe). Os resultados representam a média e erro padrão de células de seis indivíduos de diferentes. * $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre o grupo controle (Meio 199) e os grupos experimentais (Le, ME ou MELe).

5.4 ÍNDICE DE FAGOCITOSE DE CÉLULAS MN DO SANGUE PARA *G. Lamblia*

Na figura 7, estão apresentados os índices de fagocitose das células MN para *G. lamblia*. Observou-se que levamisol aumentou os índices de fagocitose das células MN. Houve redução da atividade fagocítica das células MN quando tratadas com a microemulsão. As células MN tratadas com levamisol incorporado à microemulsão apresentaram índices fagocíticos similares às células tratadas por levamisol e maiores aos índices das células não tratadas.

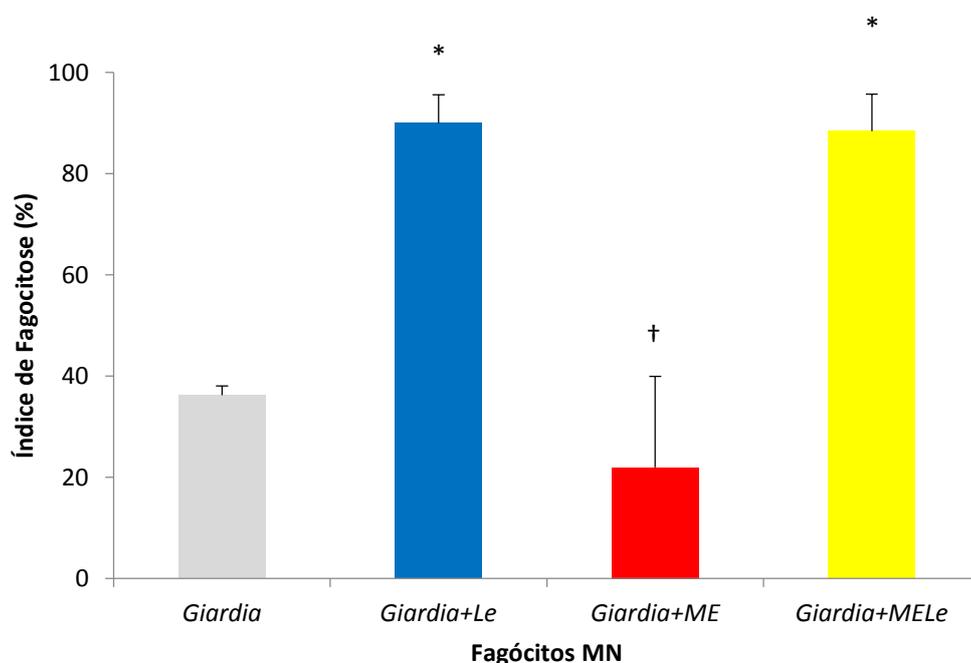


Figura 7 - Índice de fagocitose (%) das células MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe) na presença de *G.lamblia*. Os resultados representam a média e erro padrão de células de seis indivíduos de diferentes. * $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre o grupo controle (Meio 199) e os grupos experimentais (Le, ME ou MELe); † $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Le, ME ou MELe).

5.5. ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA

A Figura 8 mostra a atividade anti-parasitária dos fagócitos MN para os trofozoítos de *G. lamblia*. Observou-se que houve aumento da atividade anti-parasitária dos fagócitos após o tratamento com levamisol. O tratamento dos fagócitos tratados com microemulsão reduziu os índices microbicidas. A microemulsão com levamisol incorporado foi capaz de aumentar os índices microbicidas dos fagócitos. Os maiores índices microbicidas para *G. lamblia* foram observados quando os fagócitos foram tratados com levamisol incorporado à microemulsão.

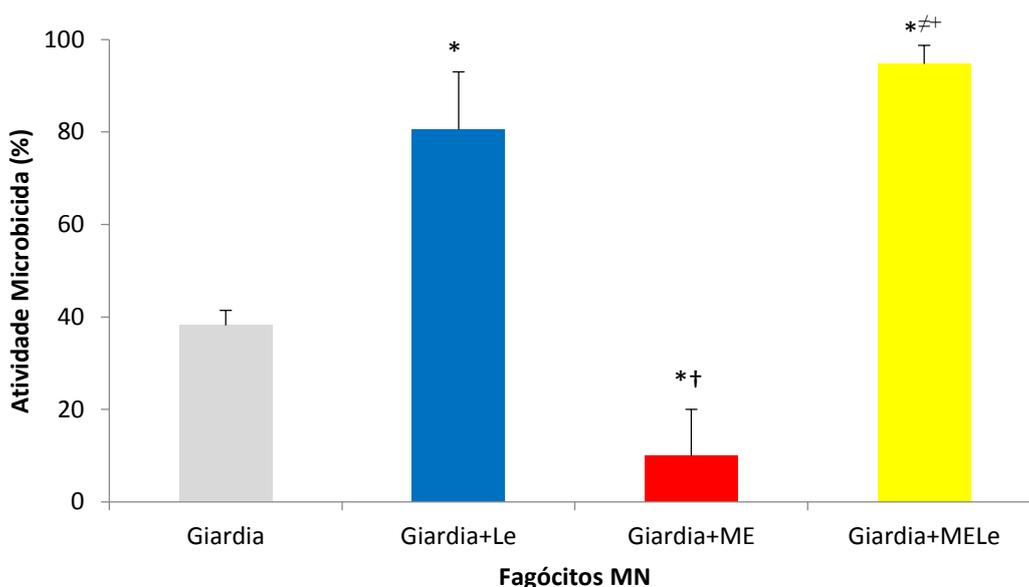


Figura 8 - Atividade anti-parasitária (%) das células MN tratados com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe) na presença de *G.lamblia*. Os resultados representam a média e erro padrão de células de seis indivíduos de diferentes. *P<0.05 diferenças estatísticas entre o grupo controle (Meio 199) e os grupos experimentais (Le, ME ou MELe); † P<0.05 diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Le e ME); ‡P<0.05 diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (ME e MELe); †P<0.05 diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Le e MELe).

5.6. ÍNDICE DE APOPTOSE

Na Figura 9, estão apresentados os índices de apoptose dos fagócitos MN na presença de *G. lamblia*. Observou-se que os índices de apoptose foram similares quando os fagócitos foram tratados com levamisol e incubados com *G. lamblia* e quando os fagócitos não foram tratados. O tratamento dos fagócitos MN com a microemulsão reduziu os índices de apoptose a valores similares aos índices observados e fagócitos MN sem tratamento e não incubado com o parasito. Quando os fagócitos foram tratados com levamisol incorporado à microemulsão e incubados com o parasito, houve aumento dos índices de apoptose quando comparados aos demais tratamentos.

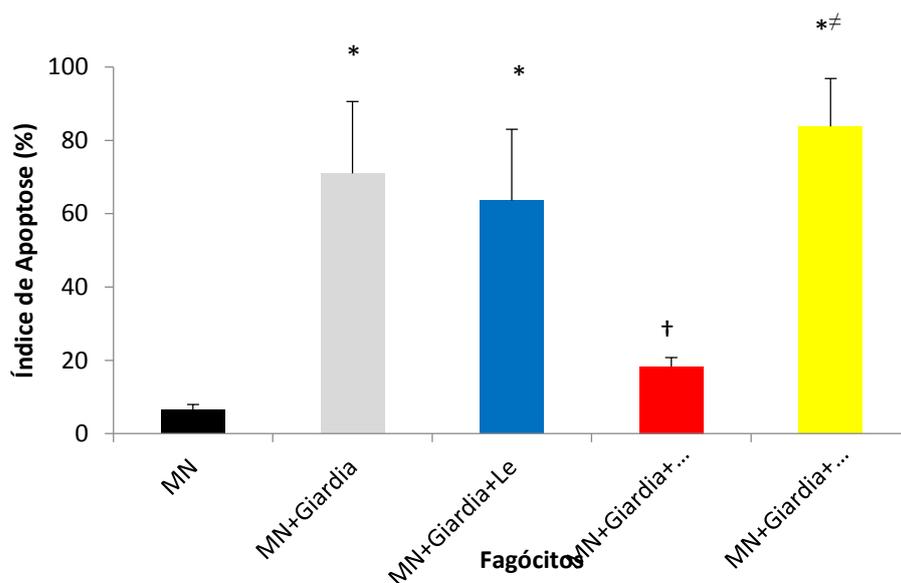


Figura 9 - Índice de apoptose (%) das células MN tratadas com solução de levamisol (Le), microemulsão (ME), e microemulsão incorporada com levamisol (MELe) na presença de *G.lamblia*. Os resultados representam a média e erro padrão de células de seis indivíduos de diferentes. *P<0.05 diferenças estatísticas entre o grupo controle (somente fagócitos não tratado) e os grupos de fagócitos tratados na presença de *G. lamblia* (Le, ME ou MELe); † P<0.05 diferenças estatísticas entre os tratamentos (Le, ME ou MELe); #P<0.05 diferenças estatísticas entre os fagócitos incubados *G. lamblia* e os os fagócitos tratados MELe e incubados *G. lamblia*.

5.7 LIBERAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR PELOS FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

A Figura 9 mostra a liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN do sangue periférico humano na presença de levamisol, microemulsão e levamisol incorporados à microemulsão. Observa-se que houve aumento da liberação de Cálcio intracelular pelos fagócitos mononucleares quando tratados com Levamisol. O tratamento dos fagócitos com a microemulsão e com levamisol incorporado à microemulsão reduziu a liberação de cálcio intracelular. Não houve diferença estatística na liberação de cálcio intracelular entre os fagócitos tratados com microemulsão e os tratados com levamisol incorporado à microemulsão (Figura 10 e Figura 11).

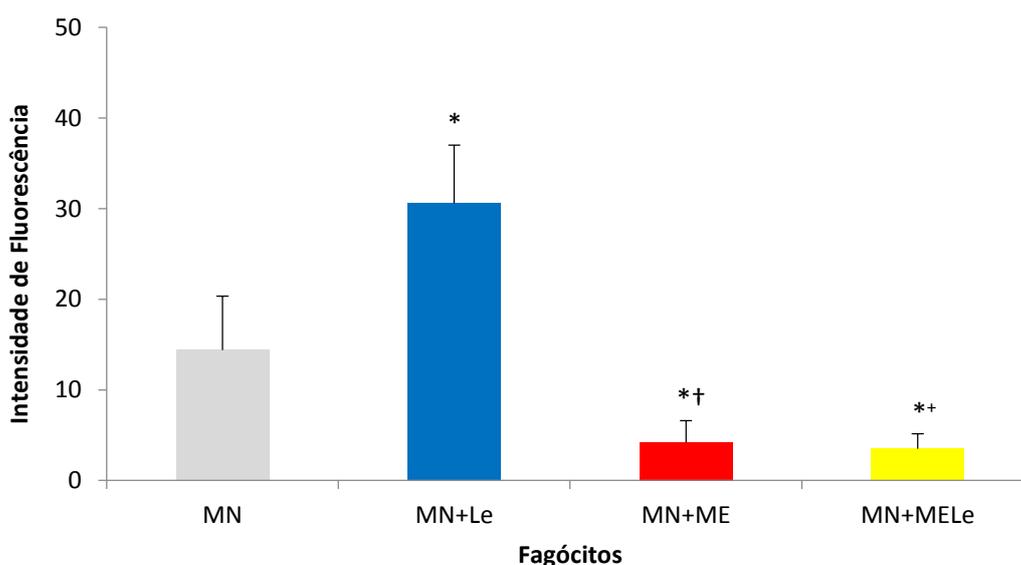


Figura 10 - Liberação de cálcio intracelular por fagócitos mononucleares (MN) do sangue indicado pela intensidade de fluorescência (filtro na faixa de 530/30nm). Fagócitos MN sangue foram pré-incubados ou não com solução de levamisol, microemulsão e levamisol incorporado na microemulsão. * $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre os fagócitos não tratados e os fagócitos tratados (Le, ME ou MELe); † $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Le e ME); †* $P < 0.05$ diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Le e MELe).

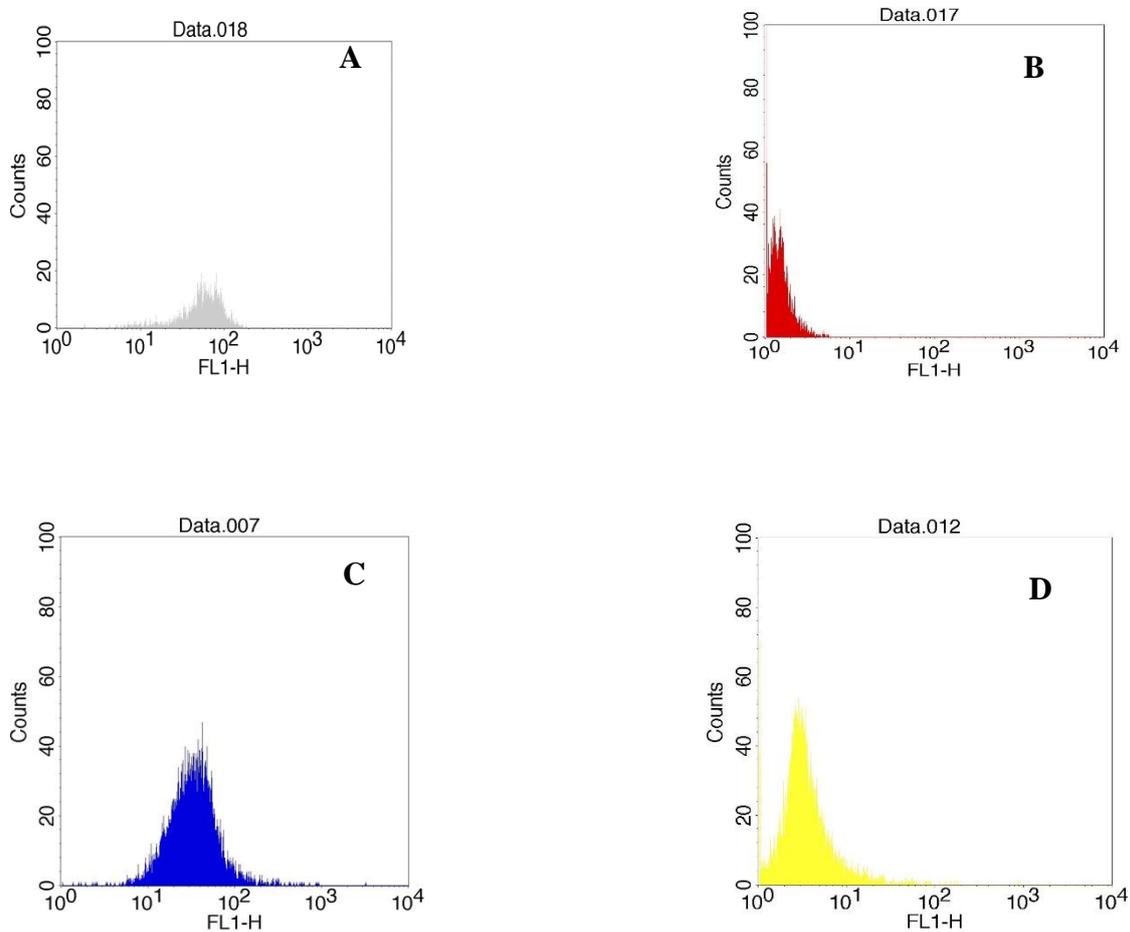


Figura 11 - Intensidade de liberação de Ca^{2+} pelos fagócitos MN do sangue tratados por levamisol, microemulsão e levamisol incorporado à microemulsão. As células foram marcadas com Fluor-3, e as análises de imunofluorescência foram realizadas por citometria de Fluxo (Facsalibur, Becton Dickson, USA).(filtro na faixa de 530/30nm) A. grupo controle (só mn); B. grupo: MN+ME; C. Grupo: MN+LE; D. Grupo: MN+MELe.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com efeitos colaterais minimizados (Cera 2001; Bruxel et al. 2012). Estudos mostram que a forma farmacêutica em que são veiculados os fármacos é de grande importância e tem responsabilidade direta pelos efeitos terapêuticos dos medicamentos, em razão de poder modificar favoravelmente ou não, a biodisponibilidade deles (Gibaldi et al. 1970; (Attwood & Florence 1985, Bruxel et al. 2012).

No presente estudo, foi avaliado o efeito de uma formulação microemulsionada líquida para a veiculação do Cloridrato de Levamisol a partir de Oletado de sorbitano, Polissorbato 80, 1-butanol, triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico e água destilada sobre a *G. lamblia*, visando à modificação da liberação desse ativo para emprego como alternativo no tratamento de giardíase.

As microemulsões possuem duas tendências básicas, dependendo das características dos seus constituintes: alta capacidade de incorporação do fármaco no veículo e efeito intensificador de permeação (Sintov et al. 2004). Pelo fato de apresentarem tensão interfacial baixa, as MEs proporcionam um excelente veículo, e suas proporções entre as fases aquosa, lipofílica e tensoativo, promovem a transição do fármaco do veículo para o estrato córneo lipofílico (Kreilgaard 2002, Sintov et al. 2004). Tais características tornam as MEs vantajosas em relação às formas farmacêuticas orais convencionais (Kreilgaard 2002, Gradzielski 2008).

Entretanto, a estabilidade de sistemas emulsionados depende intrinsecamente da interação interfásica estabelecida pelo agente emulsivo entre as fases imiscíveis que as constituem. A escolha, proporção e a característica do tensoativo a ser utilizado na preparação almejada são previstos por meio da verificação do EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) das substâncias o que permite predizer o tipo de comportamento esperado do composto frente a substâncias polares e apolares (Lawrence & Rees 2000; Zanin et al. 2002).

A fração da mistura de tensoativos SP/TW/BT depende do fármaco ou princípio ativo a ser incorporado. O EHL requerido pode variar de acordo com o produto a ser incorporado (Chaud et al. 2014, Pessoa et al. 2015). Neste estudo, o sistema microemulsionado foi previamente estabelecido, sendo que a fração da mistura de tensoativos utilizada no sistema SP/TW/BT (Span 80® (SP); Tween 80® (TW) e 1-butanol (BT) originou diversos sistemas com as mais variadas características e tipos de organização a partir de uma ampla faixa de combinação de componentes. As regiões delimitadas no diagrama de fases foram: Microemulsão líquida (MEL), Microemulsão gel (MEG), Emulsão gel (EG), Separação de Fases (SF). A fração da mistura de tensoativos utilizada no sistema SP/TW/BT na razão 3,5:5,5:1,0, proporcionou um valor de EHL igual ao requerido pelo Triglicérides de ácido cáprico/caprílico (Ribeiro et al. 2015).

Estudos afirmam que o número de EHL elevado, como os requeridos pelo triglicérides de ácido cáprico/caprílico, indica propriedades mais hidrofílicas e, além disso, proporcionam um menor crescimento do núcleo e diminuição do tamanho final da partícula (Housaindokht & Pour 2012). Esses fatos são teoricamente esperados, uma vez que o ajuste adequado do EHL tem a capacidade de produzir sistemas com reduzido diâmetro de partícula, o que desencadeia sistemas com maior estabilidade termodinâmica

(Aboofazeli et al. 2000). Este estudo, apesar do desenvolvimento de diagrama com ampla área de sistemas estáveis, com amplos domínios de sistemas translúcidos líquidos e géis observados na parte superior do diagrama, com proporções acima de 40% da fase de mistura de tensoativos, foi utilizado somente a microemulsão *6MLe*, conforme previamente estabelecida como um sistema mais estável SP/TW/BT, durante um período de até 90 dias (Brito et al. 2015). A estabilidade desse sistema SP/TW/BT pode estar relacionada com as fracas interações intermoleculares o que resulta em baixa viscosidade, podendo, portanto, ser adequada para administração oral, parenteral, pulmonar ou mesmo ocular (Lawrence & Rees 2012).

Apesar da possibilidade de utilização em várias vias de administração, a microemulsão incorporada com Levamisol foi desenvolvida para veiculação oral (Ribeiro et al. 2015). As cápsulas e comprimidos são as formas farmacêuticas de fácil administração o que permite maior aceitação do tratamento pelo paciente (Bagwe et al. 2001, Aguiar et al. 2002). Além disso, esse tipo de sistema de liberação pode melhorar a eficácia terapêutica, reduzir o volume de fármaco e veículo na formulação, minimizar os efeitos tóxicos (Lawrence & Rees 2012) e desencadear respostas imunomoduladas (Cui et al. 2003; Honório-França et al. 2008; França & Honório-França 2012).

A imunomodulação deve ser controlada e eficiente para promover a erradicação da patologia sem causar dano ao hospedeiro (Riet et al. 2007). Este e outros fatores associados fazem com que apenas a resposta imune do hospedeiro possa não ser suficiente em todos os casos, com isso, a utilização de sistemas de liberação modificada de fármacos é uma alternativa viável para a modificação da liberação de estímulo, como o Levamisol (Sajan et al. 2009, Mandal et al. 2010).

Estudos relatam que a aplicação de sistemas de liberação modificada adsorvidas com diferentes substâncias orgânicas com o objetivo de modular células MN potencializam a fagocitose e atividade anti-parasitária (Scherer et al., 2011; Fagundes et al., 2012, Reinaque et al. 2012; Hara et al. 2013, Possamai et al. 2013, Pessoa et al., 2015, Nunes et al. 2015). Fagocitose e atividade microbicida de células imunocompetentes têm sido consideradas como um importante mecanismo de defesa para várias infecções (França et al. 2010, Morceli et al. 2011). Além disso, a fagocitose desempenha um papel importante na patogenicidade de *G. lamblia*, portanto, a capacidade dos MN em fagocitar trofozoítos de giárdia tem sido alvo de investigações.

Cloridrato de levamisol, 1-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazol[2,1-b] tiazol-cloridrato, é um anti-helmíntico eficiente e de amplo espectro para o tratamento de nematóides gastrointestinais em seres humanos e em animais e é utilizado na dose de 5-40 mg kg⁻¹, dependendo da espécie de parasitas envolvidos (Amery & Bruynseels 1992).

A literatura tem relatado que o levamisol pode ativar a imunidade inata e levar a melhores respostas imunes adaptativas, particularmente para a imunidade mediada por células (Li et al. 2009). O interesse clínico do levamisol é dirigido para os efeitos imunoestimulantes, principalmente para o tratamento de câncer (Janik et al. 1993; Connell et al. 2006) e no desenvolvimento de adjuvantes para vacinas (Alavian & Tabatabaei 2010). Alguns autores consideram que o levamisol é um fármaco de classificação biofarmacêutica III, indicando que, em virtude de problemas com permeabilidade, sua biodisponibilidade oral pode ser afetada (Shaji & Jadhav 2010).

Ensaio farmacológico indicam que a levamisol atua como um estimulante ganglionar e provoca contração muscular dos nematoides impedindo a mobilidade e levando à paralisia do *Ascaris lumbricoides*. Análises bioquímicas também sugerem

inibição da enzima fumarato redutase (Coles et al 1975). Além das propriedades anti-helmínticas, Renoux e Renoux (1971) verificaram que o levamisol pode atuar na imunoestimulação (Stogaus & King 1995). Desde então, diversas pesquisas têm buscado demonstrar que diferentes parâmetros imunes, tanto *in vivo* como *in vitro*, podem ser modulados pelo levamisol (O'Connell et al. 2006; Holcombe et al. 2006; Bisalla et al. 2009; Zhang et al. 2009; Sayad et al. 2012).

Para a realização das interações dos fagócitos mononucleares na presença do sistema microemulsionado de levamisol, foi necessário realizar a identificação dos tipos celulares, esta análise permitiu identificar os marcadores de superfície celular, por sua vez denominados de CD (“cluster of differentiation”) os quais são úteis para identificação de preparações celulares na utilização em ensaios biológicos *in vitro* (Zola et al 2000). Para este estudo foram utilizados anticorpos monoclonais marcados com FITC e PE e a partir destas marcações foi possível identificar a população de células utilizadas, garantido para o trabalho um número considerável de células que expressaram os marcadores CD14⁺ permitindo assim seu uso para as análises e impedindo interferência de outras populações celulares.

Neste estudo, observa-se que a viabilidade dos fagócitos mononucleares do sangue humano, não foi alterada após a incubação com levamisol e com a microemulsão incorporada ao levamisol. A viabilidade celular foi acima de 90%. Desse modo, o ensaio de viabilidade celular mostrou que o levamisol e a microemulsão incorporada ao levamisol não causaram danos ao DNA e o RNA, e, portanto, não apresentaram efeitos citotóxicos.

Na literatura, vários autores também relacionam a viabilidade celular com a atividade funcional, mostrando que estímulos como plantas medicinais (Scherer et al.,

2011; Reinaque et al. 2012; Cortês et al. 2013, Pessoa et al. 2015), hormônios (Fagundes et.al. 2012 e Hara et al. 2013) e aminoácidos (Guimarães et al. 2013) e fármacos (Ribeiro et al. 2015) podem aumentar a fagocitose e atividade anti-parasitária.

Neste estudo, o sistema microemulsionado incorporado ao levamisol foi capaz de aumentar a fagocitose de trofozoítos de *G. lamblia* pelas células mononucleares, e esse aumento refletiu sobre os mecanismos microbicidas celulares. Os maiores índices microbicidas dos fagócitos MN para *G. lamblia* foram observados quando essas células foram previamente tratadas com microemulsão incorporado ao levamisol.

Fagocitose e atividade microbicida têm sido consideradas como um importante mecanismo de defesa para várias infecções bacterianas (Honorio-França 2001; Linden 2008; França 2011) fúngicas (Kulwein & Irwin 2001), e infecções por protozoários (França-Botelho et al. 2010; França-Botelho et al. 2012). Também o levamisol incorporado à microemulsão apresenta capacidade de estimular a fagocitose das células mononucleares por trofozoítos amebianos (Ribeiro et al. 2015).

Estudos têm buscado elucidar o potencial imunoestimulador do levamisol com capacidade de controle de diversas parasitoses (Holcombe et al. 2006; Bisalla et al. 2009). Neste trabalho, os fagócitos MN expostos a *G. lamblia* e estimulados pelo sistema microemulsionado ao levamisol incorporado mostraram aumento da fagocitose, da atividade anti-parasitária e de morte por apoptose. Interessante que esse sistema micromulsão/levamisol potencializou a apoptose com valores superiores aos encontrados quando os fagócitos foram tratados somente com levamisol, demonstrando sua capacidade imunomoduladora para *G. lamblia* quando incorporado à microemulsão.

Na literatura, alguns trabalhos relatam que a indução de apoptose pode contribuir para a patogênese da giardíase, devido à perda de função da barreira epitelial

da mucosa intestinal e aumento da permeabilidade de uma forma dependente da caspase-3 (Chin et al. 2002), enquanto outros relatam que a infecção da *G. lamblia* em humanos é resultante de uma combinação de transporte epitelial e disfunção da barreira da mucosa intestinal (Troeger et al. 2006). As caspases compreendem uma família de proteases especializadas que contêm uma cisteína no sítio ativo que cliva os alvos no seu ácido aspártico específico. As caspases, não só participam na ativação progressiva de outras caspases, mas também podem contribuir para outros processos, tais como na redução de volume da célula (picnose), condensação de cromatina, fragmentação nuclear (cariorrexe), e formação de vesículas de membrana de plasma de (Kroemer et al. 2009, Marsden & Strasser 2003). Todos estes processos levam a alterações na morfologia celular, resultando em celular e núcleo encolhimento sem escapamento de conteúdo celular com o micro ambiente.

Uma nova função de caspase-11 foi identificada na regulação de infecção bacteriana patogênica em macrófagos (Akhter et al. 2012). Neste estudo, os altos índices de apoptose, observados na presença de sistema microemulsionado com levamisol incorporado, provavelmente estão associados aos mecanismos efetivos da fagocitose que culminam com a morte do parasito.

A ação de sistema de liberação controlada também está associada a um número de processos tais como alterações no Ca^{2+} intracelular por fagócitos (Fagundes et al. 2012; Hara et al. 2013; Guimarães et al. 2013). Neste trabalho, o levamisol se mostrou um potente fármaco indutor de cálcio intracelular em fagócitos humanos. No entanto, o levamisol, quando incorporado ao sistema microemulsionado, reduziu esse influxo de cálcio intracelular. A literatura ressalta que a resposta de Ca^{2+} intracelular depende de eventos de fosforilação durante o metabolismo oxidativo celular (Carrichon et al. 2011), e de estímulos como hormônios (Morceli et al. 2013) e citocinas (Fagundes et al. 2013).

Considerando que *G. lamblia* vive no intestino em contato constante com os fatores imunológicos da mucosa, a estimulação de células MN, mediante o tratamento com o sistema microemulsionado de levamisol, pode ser um importante mecanismo de proteção conferido pela imunidade de mucosa para as infecções por *G. lamblia*.

Com este trabalho, verificou-se que a microemulsão foi capaz de melhorar a eficácia terapêutica do levamisol, potencializando a atividade fagocítica, microbicida e indução de apoptose. Dessa forma, a microemulsão pode ser uma alternativa adequada para o aproveitamento mais eficiente dos potenciais imunológicos do levamisol. Deve ser considerado ainda que o habitat do parasito e os resultados do presente estudo reforçam a necessidade da integridade da imunidade do hospedeiro, tanto sistêmica quanto de mucosa, durante as infecções por *G. lamblia*.

Cabe ressaltar que o levamisol induziu altos índices de apoptose e de cálcio intracelular. Todavia, o levamisol, quando incorporado na microemulsão, apesar de induzir altos índices apoptóticos, determinou reduzidos níveis de cálcio intracelular, sugerindo que os mecanismos de atividade morte do parasito podem ser diferenciados.

De acordo com os dados encontrados, mais estudos devem ser conduzidos buscando elucidar os mecanismos imunomoduladores mediados pelo sistema microemulsionado de levamisol, em doenças parasitárias.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, foi avaliado o efeito de uma formulação microemulsionada líquida para a veiculação do Cloridrato de Levamisol a partir de Oletado de sorbitano, Polissorbato 80, 1-butanol, triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico e água destilada 6M, por ter sido a mais estável em condições extremas e submetida à incorporação do fármaco, sobre a *G. lamblia*, visando à modificação da liberação deste ativo para emprego como alternativo no tratamento de giardíase. Com os resultados dos experimentos, concluiu-se que:

- As células MN, tratadas com levamisol incorporado à microemulsão, apresentaram índices fagocíticos similares às células tratadas por levamisol e maiores aos índices das células não tratadas.
- O tratamento dos fagócitos tratados com microemulsão reduziu os índices microbicidas. Os maiores índices microbicidas para *G. lamblia* foram observados quando os fagócitos foram tratados com levamisol incorporado à microemulsão.
- O tratamento dos fagócitos MN com a microemulsão reduziu os índices de apoptose a valores similares aos índices observados e fagócitos MN sem tratamento e não incubado com o parasito. Quando os fagócitos foram tratados com levamisol incorporado à microemulsão e incubados com o parasito, houve aumento dos índices de apoptose quando comparados aos demais tratamentos.
- O tratamento dos fagócitos com a microemulsão e com levamisol incorporado à microemulsão reduziu a liberação de cálcio intracelular. Não houve diferença

estatística na liberação de cálcio intracelular entre os fagócitos tratados com microemulsão e os tratados com levamisol incorporado à microemulsão.

- A microemulsão foi capaz de melhorar a eficácia terapêutica do levamisol, potencializando a atividade fagocítica, microbicida e indução de apoptose. Dessa forma, a microemulsão pode ser uma alternativa adequada para o aproveitamento mais eficiente dos potenciais imunológicos do Levamisol.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe N & Teramoto I 2012. Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage bat the rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitol Res*, 110: 1025-1028.
- Aboofazeli R, Barlow DJ, Lawrence MJ 2000. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: II. Photon correlation spectroscopy. *AAPS PharmSci*, 2(3):1-10.
- Abou-Shady O, El Raziky MS, Zaki MM, Mohamed RK 2011. Impact of *Giardia lamblia* on growth, serum levels of zinc, copper, and iron in Egyptian children. *Biol Trace Elem Res*, 140:1-6.
- Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14: 447–475.
- Aguiar JC, Hedstrom RC, Rogers WO et al. 2002. Enhancement of the immune response in rabbits to a malaria DNA vaccine by immunization with a needle-free jet device. *Vaccine*, 20:275–280.
- Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García R, Laclette JP, Morales-Montor J 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitol*, 27(10): 450-458.
- Akhter A, Gavrilin MA, Frantz L et al 2009. Caspase-7 activation by the Nlrc4/Ipaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathog*, 5:e1000361
- Alavian S-M, Tabatabaei S-V 2010. Effects of oral levamisole as an adjuvant to hepatitis B vaccine in adults with end-stage renal disease: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Clin Ther*, 32: 1–10.
- Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, et al. 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun*, 62: 5397–5403.
- Ali SA, Hill DR. 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis*, 16:453–460.
- Alkafri A, Ismail MT 2008. Prevalence and risk factors for giardiasis among primary school children in Damascus, Syria. *Saudi Med J*, 29: 234–240.
- Almerie MQ, Azzouz MS, Abdessamad MA et al. 2008. Prevalence and risk factors for giardiasis among primary school children in Damascus, Syria. *Saudi Med. J*, 29: 234–240.
- Alum A, Rubino JR, Ijaz MK 2010. The global war against intestinal parasites--should we use a holistic approach? *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ Int Soc Infect Dis*, 14: e732–e738.
- Amery WK, Bruynseels JP 1992. Levamisole, the story and the lessons. *Int. J. Immunopharmacol*. 14: 481–486.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,90(17):7915-7922.

- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E et al. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*, 8(6):413
- Asad NR et al. 1994. Lethal interaction between hydrogenperoxide and 0- phenanthroline in *Escherichia coli*. *British J of Med of Biol Res*, 27:2551-5.
- Attwood DT and Florence AT 1985. Surfactant systems : their chemistry, pharmacy and biology. Chapman and Hall. London.
- Babior BM 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med*, 298: 659–668.
- Bagdade JD, Nielson KL, Bulger RJ 1972. Reversible abnormalities in phagocytic function in poorly controlled diabetic patients. *Am J Med Sci*, 263: 451-456.
- Bagwe RP, Kanicky JR, Palla BJ et al. 2001. Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 18(1): 77-140.
- Barbosa J, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG et al. 2008. Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. *Travel Med Infect Dis* 6: 234–239.
- Baldursson S & Karanis P 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2004-2010. *Water Res*, 45(20):6603-6614.
- 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.
- Behera B, Mirdha BR, Makharia GK et al. 2008. Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. *Dig Dis Sci*, 53: 672–679.
- Bellinati-Pires R,Salgado MM, Hypolito IP et al. 1995. Application of a fluorochrome-lysostaphin assay to the detection of phagocytic and bactericidal disturbances in human neutrophils and monocytes. *J Investig Allergol Clin Immunol*, Nov-Dec; 5(6):337-42
- Belosevic M, Daniels CW 1992. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by cytokine-activated macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 87: 304–309.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL 2003. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, 359:564-71.
- Bernander R et al. 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol*, 3: 55–62.
- Bisalla M, Adamu S, Ibrahim ND et al. 2009. Effect of immunomodulation with levamisole on the course and pathogenesis of acute experimental *Trypanosoma congolense* infection in sheep. *Afr J Biotechnol* 8.
- Blecha F 2001. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *Vet Clin North A. Food Anim Pract*, 17: 621–633.
- Boonme P, Krauel K, Graf A, Rades T, JUnyaprasert VB 2006. Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol. *AAPS J*, 7: 1–6.

- Bruschi ML, Panzeri H, Freitas O 2006. Sistemas de liberação de fármaco intra bolsa periodontal. *Brazilian J of Pharm Sciences*, São Paulo, 42, (1): 29–47.
- Bruxel F, Laux M, Wild LB et al. 2012. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quim. Nova*, 35: 1827-1840.
- Buret AG, Scott KG-E, Chin AC 2002. Giardiasis: pathophysiology and pathogenesis *Giardia*, the cosmopolitan parasite. CAB International, In: Olson B, Olson ME, Wallis PM, eds, Wallingford, UK:2002;109–27.
- 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.
- 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.
- Carrichon LA, Picciocchi F, Debeurme A et al. 2011. Characterization of superoxide overproduction by the D-LoopNox4-Nox2 cytochrome b558 in phagocytes-differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Bioch Biophys Acta*, 1808: 78-90.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2010. Giardiasis Surveillance -United States, 2006–2008. *Surveillance Summaries, MMWR*,59(SS6).
- Cera RFL 2001. Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsão lipídicas: formulação e liberação in vitro. Araraquara, 145p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].
- Celiksöz A, Aciöz M, Değerli S et al. 2005. Effects of giardiasis on school success, weight and height indices of primary school children in Turkey. *Pediatr. Int. Off. J Jpn Pediatr Soc*, 47: 567–571.
- Chaud NGA, França EL, Ribeiro EB et al. 2014. Development and characterization of a neomaterial based microemulsion as a vehicle of *Lippia sidoides*. *Sodebras*, 9:31-38.
- Chin AC, Teoh DA, Scott KG-E et al. 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.
- Coles GC, East JM, Jenkins SN 1975. The mechanism of action of the anthelmintic levamisole. *Gen Pharmacol: The Vascular System*, 6:309–313.
- Connell MJ, Sargent DJ, Windschitl HE et al. 2006. Randomized clinical trial of high-dose levamisole combined with 5-fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant therapy for high-risk colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 6: 133–139.
- Constantinides PP, Yiv SH 1995. Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions. *Int J Pharm*, 115: 225–234.
- Côrtes MAP, França EL, Reinaque APB et al. 2013. Imunomodulação de fagócitos do sangue humano pelo extrato de *Strychnos pseudoquina* ST. HILL adsorvido em microesferas de polietilenoglicol. *Polímeros* (São Carlos. Online), 23: 402-409.
- Cui Z, Baizer L, Mumper R J 2003. Intradermal immunization with novel plasmid DNA-coated nanoparticles via a needle-free injection device. *J. Biotechnol.* 102: 105–115.

- Dalmora ME, Dalmora SL, Oliveira AG 2001. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int. J. Pharm.* 222: 45–55.
- Deniz Ayli M, Ensari C, Ayli M et al. 2000. Effect of oral levamisole supplementation to hepatitis B vaccination on the rate of immune response in chronic hemodialysis patients. *Nephron* 84: 291–292.
- Dib HH, Lu SQ, Wen SF 2008. Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res*, 103:239–251.
- Dixon BR, Parenteau M, Martineau C et al. 1997. A comparison of conventional microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry in the detection of *Giardia lamblia* cysts in beaver fecal samples. *J Immunol Methods*, 202: 27–33.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M et al. 2002. Free radical- induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 32:1102-1115.
- DuBois KN, Abodeely M, Sakanari J et al. Lee M, McKerrow JH, Sajid M 2008. Identification of the major cysteine protease of *Giardia* and its role in encystation. *J. Biol. Chem*, 283: 18024–18031.
- Eckmann L 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 25: 259–270.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD et al. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol Baltim Md 1950* 164: 1478–1487.
- Elisabeth C A, Pegotti A 2010. Centro de Informações em Saúde pra Viajantes. *APS, Juiz de Fora*, 13 (2) 231-240.
- Escobedo AA, Alvarez G, González ME et al. 2008. The treatment of giardiasis in children: single-dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. *Ann Trop Med Parasitol*, 102: 199–207.
- Etthad GH, Danyani A, Nemati A 2010. Effect of *Giardia* infection on nutritional status in primary School children in Northwest Iran. *PJBS*, 1(5):229-234.
- Fagundes DLG; França EL; Morceli G et al. 2013. The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers. *J Immunol Res*, 2013: e590190.
- Fagundes DLG, Franca EL, Hara CCP et al. 2012. Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes. *Int J of Pharmacol*, 8: 510-518.
- Fanun M 2012. Microemulsion as delivery systems. *Curr Opin Pharmacol*, 17: 306–313.
- Faraji AH, Wipf P 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17: 2950–2962.
- Farthing MJ 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 24: 79–88.
- Faubert G 2000. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 13: 35–54.

- Faust EC, Russell PF, Jung RC, Craig 1970. Faust's Clinical Parasitology. 8th edition, La Febiger, Philadelphia.
- Flanagan PA 1992. *Giardia*— diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.*,109:1–22.
- Feng Y, Xiao L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Ver*, 24: 110–140.
- França-Botelho AC, Honório-França AC, França EL et al. 2006. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostral leukocytes. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 95: 438–443.
- França EL, Ribeiro EB, Scherer EF et al. 2014. Effects of *Momordica charantia* L. on the Blood Rheological Properties in Diabetic Patients. *BioMed Res. Int.* 2014 (8): 2014.
- França EL, Bitencourt RV, Fujimori M et al. 2011. Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* 44: 1–7.
- França EL, Bittencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honório-França AC 2011-a. Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. *J Microbiol, Immunology and Infection*, 44: 1-7.
- França EL, Morceli G, Fagundes DLG et al. 2011-b. Secretory IgA- Fc Receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *Apmis*, 1. 119 (10): 710-719.
- França EL et al. 2010. Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. *In. J Phytomed*, 2: 354-362.
- Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E et al. 2009. Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog.* 5: e1000560.
- Gallego E, Alvarado M, Wasserman M 2007. Identification and expression of the protein ubiquitination system in *Giardia intestinalis*. *Parasitol. Res.* 101: 1–7.
- Gardner TB, Hill DR 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 14: 114–128.
- Gascón J 2006. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. *Digestion* 73 (1): 102–108.
- Geurden T, Olson M 2011. *Giardia* in Pets and Farm Animals, and Their Zoonotic Potential. In: Luján HD, Svärd S (Eds.), *Giardia*, Springer Vienna, pp. 71–92.
- Gibaldi MD, Davidson ME, Plaut MA et al. 1970. Modification of penicillin distribution and elimination by probenecid. *Int J Clin Pharma-col*, 3:182-189.
- Gradzielski M 2008. Recent developments in the characterisation of microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13: 263–269.
- Guimarães PCL, Honório-França AC, Hara CCP et al. 2013. Modulation of Human Colostrum Phagocyte Activity by the Glycine-Adsorbed Polyethylene Glycol Microspheres. *J of Chem*, 2013: 1-8.

- Guimarães S, Sogayar MIL 2002. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. *Rev. Saúde Pública* 36: 63–68.
- Hara CCP, Honorio-França AC, Fagundes DLG et al. 2013. Melatonin Nanoparticles Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres as Activators of Human Colostrum Macrophages. *J Nanomater.* 2013: e973179.
- Hausen MA, Freitas JCM, Monteiro-Leal LH 2006. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol*, 113: 135–141.
- Health Canada 2012. [homepage na Internet] Guidelines for Canadian drinking water quality: guideline technical Document —Enteric protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. Water, air and climate change bureau, healthy environments and consumer safety branch, Health Canada, Ottawa, Ontario. (Catalogue No H129-23/2013E-PDF). Disponível em: <http://publications.gc.ca/pub?id=436518&sl=0>. Acesso em 20/01/2015.
- Hill DR, Pearson RD 1987. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun*, 55: 3155–3161.
- Holcombe RF, McLaren CE, Milovanovic T 2006. Immunomodulation with low dose levamisole in patients with colonic polyps. *Cancer Detect Prev*, 30: 94–98.
- Ho, Hsiao CC, Sheu MT 1996. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *J Pharm Sci.* Feb, 85(2):138-43.
- Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MMS et al. 2001. Colostral neutrophils express IgA Fc receptors (CD89) lacking y chain association that mediate non-inflammatory properties of secretory IgA. *J Leukoc Biol*, 69:(2)289-96.
- Honorio-França AC, Moreira C, Boldrini F et al. 2008. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of “ Quina do Cerrado ” (*Strychnos pseudoquina* ST . HILL). *Act Cir Bras*, 23: 504–510.
- Honorio-França AC, Lanes PKD, Ribeiro EB, Franca EL 2013. Chronopharmacology for anthelmintic: immune and modified release of drugs prospectus. *Scienc Int*, 1: 22–28.
- 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):1337-1346.
- Housaindokht MR, Pour AN 2012. Study the effect of HLB of surfactant on particle size distribution of hematite nanoparticles prepared via the reverse microemulsion. *Solid State Sciences*, 14: 622-625.
- Huang DB, White AC 2006. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin North Am*, 35:291–314.
- Hunter PR, Thompson RCA 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 35: 1181–1190.
- Janik J, Kopp WC, Smith JW et al. 1993. Dose-related immunologic effects of levamisole in patients with cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 11: 125–135.
- Kalachandra S, Takamata T, Lin DM 2006. Stability and release of antiviral drugs from ethylene vinyl acetate (EVA) copolymer. *J Mater Sci: Mater Med*, 17: 1227-1236.

- Katagiri S, Oliveira-Siqueira TCG 2007. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema de diagnóstico. *Arq Inst Biol*, São Paulo, 74 (2): 175 -184.
- Katona P, Katona-APTE J 2008. The interaction between nutrition and infection. *Clin Infect Dis*.46:1582-8,
- Keister DB 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 487–488.
- Kockisch S, Rees GD, Tsibouklis J, Smart JD 2005. Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 59: 207–216.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC et al. 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102: 718–725.
- Koot BGP, ten Kate FJW, Juffrie M, Rosalina I, Taminiu JJAM, Benninga MA 2009. Does *Giardia lamblia* cause villous atrophy in children?: A retrospective cohort study of the histological abnormalities in giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 49(3):304-308.
- 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.
- Kreilgaard M 2002. Influence of microemulsion on cutaneous drugs delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 54:77–98.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al. 2009. “Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009,” *Cell Death Differ*, 16 (1): 3–11.
- Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC et al. 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102: 718–725.
- Kühlwein E, Irwin M 2001. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol*, 117(1–2): 51–57.
- Lane S & Lloyd D 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*, 28:123–147.
- Langford TD, Housley MP, Boes M et al. 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia spp*. *Infect Immun*, 70: 11–18.
- Lawrence MJ, Rees GD 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 45: 89–121.
- Lawrence MJ, Rees GD 2012. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 64:175–193.
- Li E, Zhou P, Petrin Z and Singer SM 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 72:6642–6649.

- Lin DM, Kalachandra S, Valiyaparambil J et al. 2003. A polymeric device for delivery of anti-microbial and anti-fungal drugs in the oral environment: effect of temperature and medium on the rate of drug release. *Dental Materials*, 19: 589-596.
- Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V and McGuckin MA 2008. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol*, 1:183–197.
- Machado RL, Figueredo MC, Frade AF et al. 2001. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 91–93.
- 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: 581–585.
- Makare N, Bodhankar S, Rangari V 2001. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *J Ethnopharmacol*, 78: 133–137.
- Mandal AS, Biswas N, Karim KM et al. 2010. Drug delivery system based on chronobiology-A review. *J. Control. Release Soc.* 147: 314–325.
- Mansbach II CM 2009. Diseases producing malabsorption and maldigestion. *ACP Medicine* 2009,1-15.
- Marsden VS and Strasser A 2003. “Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more,” *Annu Rev Immunol*, 21:71–105.
- Mecfets GA et al. 1991. Acridine Orange staining reaction as na index of physiological activity in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*, 13: 87-97.
- Menezes AL, Lima VM, Freitas MT, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS 2008. Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 50(1):57-59.
- Meyer EA 1985. The epidemiology of giardiasis. *Parasitol Today* 1: 101–105.
- Midlej V, Benchimol M 2009. *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitol Int* 58: 72–80.
- Mohammed HO, Schaaf S, Wade SE 2000. Epidemiologic study of *Giardia* sp infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol*, Amsterdam. 89: 11-21.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RCA 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*. 25: 93–100.
- Morceli G, Honorio-França AC, Fagundes DLG, Calderon IMP, França EL 2013. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women. *PLoS One* 8: e56915.
- Morceli G, França EL, Magalhães V, Damasceno DC et al. 2011. Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum. *Acta Ped (Oslo)*, 100: 550-556.
- 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.

- Mowat A, Baum J 1971. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*; 284: 621-627.
- Mueller N, von Allmen N 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*; 35:1339-47.
- Mundi H, Björkstén B, Svanborg C et al. 1991. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. *Infect Immun*, 59: 4168-4172.
- Nash TE 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, 45: 585-590.
- Nematian J, Gholamrezanezhad A, Nematian E 2008. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. *Ann Trop Med Parasitol*, 102: 209-214.
- Neves DP et al 2005. *Parasitologia humana*. 11.ed. Rio de Janeiro: Atheneu.
- Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr LL, Lorntz B, Lima AA, Guerrant RL 2002. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg*, 66(5):590-593.
- Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* 1989; 38: 1031-1035.
- Nornoo AO, Zheng H, Lopes LB et al. 2009. Oral microemulsions of paclitaxel: in situ and pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* 71: 310-317.
- Nunes GT, Fagundes DLG, França JL et al. 2015. Desenvolvimento e caracterização de um agente imunomodulador a base de adsorção de sílica à microesfera de polietilenoglicol (PEG). *Rev Sodebras* 10:70-76, 2015.
- Oberhuber G, Kastner N, Stolte M 1997. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol*, 32: 48-51.
- Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA et al. 2004. Microemulsions: structure and application as drug delivery systems. *Quím Nova* 27: 131-138.
- Olszewer F 1995. *Radicais livres em medicina*. 2. ed. São Paulo: Fundo editorial Byk. 204p.
- Ortega YR, Adam RD 1997. *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 25: 545-549; quiz 550.
- Ortega-Pierres G, Smith HV, Caccio SM and Thompson RCA New tools provide further insights into *Giardia* and *Cryptosporidium* biology. *Trends in Parasitology*, 25(9): 410-416.
- Ouattara M, N'guéssan NA, Yapi A et al. 2010. Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d'Ivoire). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4: e574.
- Owen RL, Allen CL, Stevens DP 1981. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infect Immun*, 33: 591-601.
- Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiacka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder F, Svard S 2005. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, 141: 199-207.

- Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V et al. P 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51: 302–309.
- Paulino RC 2005. Detecção molecular de *Giardia* sp em amostras fecais e água : extração de DNA genômico, PCR e RFLP /. *oai:ufpr.br:234179*.
- 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 São Paulo*, 49(3):139-145.
- Pessoa RS, França EL, Ribeiro EB et al. 2015. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. *Drug Des Devel Ther*, 9: 21–31.
- Pestana KC, Formariz TP, Franzini CM et al. 2008. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 66: 253–259.
- Podlogar F, Gasperlin M, Tomsic M, Jamnik A, Rogac MB 2004. Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int J Pharm*, 276: 115–28.
- Possamai MM, Honorio-França AC, Reinaque APB et al. 2013. Brazilian Propolis: A Natural Product that Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes. *J Biomed and Biotechnol*, 2013:1–9.
- Pundt N, Peters MA, Wunrau C et al. 2009. Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent. *Arthritis Research & Therapy*, 11(1):1-10.
- Prucca CG, Lujan HD 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol*, 11: 1706–1715.
- Quihui L, Morales GG, Méndez RO et al. ME 2010. Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in school children from north western Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health* 10: 85.
- Reinaque APB, França EL, Scherer EF et al. 2012. Natural material adsorbed onto a polymer to enhance immune function. *Drug Des Devel Ther*, 6: 209–216.
- Renoux G, Renoux M, Teller MN et al. 1976. Potentiation of T-cell mediated immunity by levamisole. *Clin Exp Immunol*, 25: 288–296.
- Ribeiro EB, Lane PKD, Chaud NGA, Pessoa RS, 2015. Microemulsions with Levamisole Delivery Systems as Novel Immunomodulating Agents with Potential for Amebiasis Therapies. *Sci Adv Mater*. 7
- Riet E van, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiol* 212: 475–490.
- Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA et al. 2010. Giardiasis—why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol*, 26:75–82.
- Rosano HL 1974. Microemulsions. *J Soc Cosmet Chem*, 25(11):609-19.

- Rosoff JD, Sanders CA, Sonnad SS et al. 1989. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia* -Specific stool antigen 65 (GSA65). *J of Clin Microbiol*, 27:1977-2002.
- Roxström-Lindquist K, Ringqvist E, Palm D, Svärd S 2005. *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 73: 8204–8208.
- Sadeghi H; Borji H 2015. A survey of intestinal parasites in a population in Qazvin, north of Iran. *Asian Pac J of Tropic Dis*, 5(3): 231–233, mar.
- Sajan J, Cinu TA, Chacko AJ et al. 2009. Chronotherapeutics and Chronotherapeutic Drug Delivery Systems. *Trop J. Pharm Res* 8. (5): 46
- Shaji J, Jadhav D 2010. Newer approaches to self emulsifying drug delivery system. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2 (1): 37-42.
- Santana LA; Vitorino RR et al. 2014. Atualidades sobre giardíase. *JBM* 102:7–10.
- 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 Parasitol*, 22: 203–208.
- Sayad B, Alavian SM, Najafi F et al. 2012. Effects of Oral Levamisole as an Adjuvant to Hepatitis B Vaccine in HIV/ AIDS Patients: A Randomized Controlled Trial. *Hepat Mon*, 12: e6234.
- Scherer EF, Honório-França AC, Hara CCP et al. 2011. Immunomodulatory effects of poly(ethylene glycol) microspheres adsorbed with nanofractions of *Momordica charantia* L. on Diabetic Human Blood Phagocytes. *Sci of Adv Mat*, 3: 687-694.
- Scorza A.V. and Lappin M.R. 2004. Metronidazole for the treatment of feline giardiasis, *J Fel Med Surg* . 6: 157.
- Scott A, Nichols MD, Kuntz-Willits R et al. 2010. Modular scaffolds assembled around living cells using poly (ethylene glycol) microspheres with macroporation via a non-cytotoxic porogen, *Acta Biomater* 6, 29–38.
- Scott KG, Meddings JB, Kirk DR et al. 2002. Intestinal infection with *Giardia spp.* Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterol*, 123:1179–1190.
- Segal AW, Soothill JF 1983. Phagocytes. In: Soothill JF. *Ped immunol*. Oxford: Blackweel, p.37.
- Shahnazi M, Jafari-Sabet M 2010. Prevalence of parasitic contamination of raw vegetables in villages of Qazvin Province, Iran. *Foodborne pathogens and disease*, 7(9):1025-30.
- Shelton AA 2000. Sexually transmitted parasitic diseases. *Clin Colon Rectal Surg*, 17: 231-234.
- Silva RR, Silva CAM da, Jesus Pereira CA et al. 2009. Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and *Giardia lamblia* infections among children aged 6-71 months in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103: 512–519.

- Simsek ZF, Zeyrek, and M. A. Kurcer. 2004. Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. *J Trop.Pediatr.*50:90–93.
- Sintov AC, Shapiro L 2004. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *J Control Rel*, 95:173-183.
- Smith DL, Rommel F 1977. A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro. *J Immunol Methods*, 17: 241-247.
- Solaymani-Mohammadi S, Singer SM 2010. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol*, 126: 292–297.
- Souza DSM, Barreiros JT, Papp KM et al. 2003. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and of Lutz for the diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human feces. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 45: 339–342.
- Srisuphanunt M, Karanis P, Charoensa N, Boonkhao N, Ongerth JE, 2010. Cryptosporidium and Giardia detection in environmental waters of southwest coastal areas of Thailand. *Parasitol Res* 106:1299–1306
- Stoltzfus R, Kvalsvig J, Chwaya H et al. 2011. Effects of iron supplementation and anthelmintic treatment on motor and language development of preschool children in Zanzibar: double blind, placebo controlled study. *British Med J*, 323(7326):1389.
- Stoltzfus R I, Chwava HM, Tielsch M et al. 1997. Epidemiology of iron deficiency anemia in Zanzibari schoolchildren: the importance of hookworms. *Am J of Clin Nutrition*, 65:153-159.
- Stogaus R, King MG 1995. Is oral levamisole immunostimulation in rats mediated by reduced levels of free plasma corticosterone?. *Int. J. Immunopharmacol*, 17: 635–640.
- Sulaiman IM, Ronald F, Bern C et al. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis*, 9:1444–1452.
- Talegaonkar S, Azeem A, Ahmad F et al. 2008. Microemulsions: A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2: 238–257.
- Tan JS, Anderson JL, Watanakunakorn C et al. 1975. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. *J Lab Clin Med*, 85: 26-33.
- Tashima NT, Simões MJS, Leite CQF et al. 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: 19–24.
- Tejman-Yarden N, Millman M, Lauwaet T et al. 2011. Impaired Parasite Attachment as Fitness Cost of Metronidazole Resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 4643–4651.
- Teoh DA, Kamieniecki D, Pang G et al. 2000. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. *J Parasitol*, 86: 800–806.
- Teschke K, Bellack N, Shen H et al. 2010. Water and sewage systems, socio-demographics, and duration of residence associated with endemic intestinal infectious diseases: A cohort study. *Public Health Canada* 10:767.

- Thompson RCA 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*, 126: 15–35.
- Thompson RCA 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*, 30: 1259–1267.
- Thompson RCA. The impact of *Giardia* on Science and Society. In Ortega-Pierres G, Cacciò S, Fayer R, Mank TG, Smith HV, Thompson RCA Eds. *Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease. CAB International*. 2009; 1-11
- Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*, 32, 71–160.
- Touz MC, Conrad JT, Nash TE 2005. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, 58: 999–1011.
- Troeger H, Epple H, Schneider T et al. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56: 328–335.
- Uecker M, Copetti CE, Poleze L et al. V 2007. Infecções parasitárias: diagnóstico imunológico de enteroparasitose. Parasital infection: immunologic diagnostic of enteroparasitosis. *Rev Bras. Anal Clin*, 39(1):15-19.
- Upcroft P, Upcroft JA 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14: 150–164.
- Velloso JCR, Barbosa VF, Oliveira OMM 2007. Pesquisa de produtos Naturais: Plantas e Radicais Livres. *Rev Eletr Farm*, 4 (2): 119-130.
- Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K et al. 2004. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*, 42: 1220–1223.
- Xiao L and Fayer R 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol Science Direct*, 38:1239-1255.
- Yoder JS, Beach MJ 2002. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2007. Giardiasis surveillance--United States, 2003-2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC*, 56: 11–18.
- Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL 2000. Epidemiologic study of *Giardia sp.* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol*, 89: 11–21.
- Weitzel T, Dittrich S, Möhl I et al. 2006. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*, 12: 656–659.
- Wolfe MS 1984. Symptomatology, Diagnosis, and Treatment. In: Erlandsen SL, Meyer EA (Eds.), *Giardia Giardiasis*, Springer US, pp. 147–161.
- Wu C-Y, Benet LZ 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*, 22: 11–23.

Zaiden MF, Santos BO, Cano MAT et al. 2008. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde-GO. *Med. Ribeirao Preto Online*, 41: 182–187.

Zanin SMW, Miguel MD, Chimelli MC et al. 2002. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. *Visão Acadêmica*, 3 (11):13-18.

Zelenin AV 1999. Acridine Orange as a Probe for Cell and Molecular Biology, in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, London: *Academic*, 117–135.

Zhang W, DU X, Zhao G et al. 2009. Levamisole is a potential facilitator for the activation of Th1 responses of the subunit HBV vaccination. *Vaccine*, 27(36):4938-4946

Zhang L, Que G 2008. Influence of the HLB parameter of surfactants on the dispersion properties of brine in residue. *Colloids Surf A*, 320: 111–114.

Zimmerman SK, Needham CA 1995. Comparasion of convencional stool concentration and preserved - smear methods with merifluor *Cryptosporidium/Giardia* direct immunofluorescence assay and prospect giardia EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. *J of Clin Microbiol*, 33:1942-1943.

Ghandehari H. Phar 535: controlled drug release. Disponível em <https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introduccion%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf>. Acesso em 10/04/2015.

<https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Giardiasis/lifecycle.htm> acessado em 20/03/2015

ANEXOS

ANEXO I- Parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: LEVAMIZOL INCORPORADO À MICROEMULSÃO COMO IMUNOMODULADOR NO TRATAMENTO DE INFECÇÃO POR *Giardia lamblia*.

Pesquisador: Mara Rosa Gil Hernandez

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43667515.3.0000.5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.018.274

Data da Relatoria: 24/04/2015

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto adequada.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto pretende avaliar a modulação da atividade funcional de fagócitos do sangue pelo sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol na presença de *G. lamblia*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto trará benefícios para o tratamento de giardíase.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

UF: MT

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (66)3402-1121

E-mail: mariyaugusta@yahoo.com.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 1.018.274

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTAL DO ARAGUAIA, 10 de Abril de 2015

Assinado por:

Marly Augusta Lopes de Magalhães
(Coordenador)

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

UF: MT

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (66)3402-1121

E-mail: marlyaugusta@yahoo.com.br

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - UFMT

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA – CUA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, da pesquisa “Levamisol incorporado à microemulsão como imunomodulador no tratamento de infecção por *Giardia lamblia*.”. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não terá nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que recebe assistência. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller- UFMT- pelo telefone (65) 36157254. O objetivo deste estudo é avaliar a modulação da atividade funcional de fagócitos do sangue pelo sistema microemulsionado de cloridrato de levamisol na presença de *G. lamblia*. Os riscos relacionados com sua participação na pesquisa são mínimos, devido à pequena quantidade de material a ser colhido, com técnica adequada por profissionais devidamente habilitados e com materiais descartáveis. Os dados pessoais referentes à pessoa serão confidenciais e garantimos o sigilo de sua participação durante toda pesquisa, inclusive na divulgação da mesma. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Você receberá uma cópia desse termo onde tem o nome, telefone e endereço do pesquisador responsável, para que você possa localizá-lo a qualquer tempo. Mara Rosa Gil Hernandez - Bióloga, nº cel. 66 9204-3410, e-mail: botoaraguaia@gmail.com ou Prof. Dr. Adenilda Cristina Honório Franca UFMT/ Barra do Garças - 3402-1118; e-mail: adenildachf@gmail.com. Considerando os dados acima, CONFIRMO estar sendo informada por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa e em caso de divulgação por foto e/ou vídeo AUTORIZO a publicação. Eu (nome do participante)....., idade:.....sexo:.....Naturalidade:.....portador(a) do documento RG Nº:.....declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador principal

Data (Cidade/dia mês e ano) _____ de _____ de 201__