



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Atividade funcional de fagócitos do sangue periférico humano modulados por citocinas na presença de *Giardia lamblia*

Maximilian Wilhelm Brune

Belo Horizonte - MG

2015

Maximilian Wilhelm Brune

Atividade funcional de fagócitos do sangue periférico humano modulados por citocinas na presença de *Giardia lamblia*

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências-Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Dra. Maria Aparecida Gomes

Coorientador: Dra. Adenilda Cristina Honório-França

Belo Horizonte

2015

043

Brune, Maximilian Wilhelm.

Atividade funcional de fagócitos do sangue periférico humano modulados por citocinas na presença de *Giardialamblia* [manuscrito] / Maximilian Wilhelm Brune. - 2015.

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

Orientadora: Maria Aparecida Gomes. Co-orientador: Adenilda Cristina Honório França.

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

1. Leucócitos mononucleares. 2. *Giardia lamblia* - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Fagocitose - Teses. 5. Parasitologia - Teses. I. Gomes, Maria Aparecida. II. França, Adenilda Cristina Honório. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Colaboradores

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

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

Profa. Dr. Eduardo Luzia França

Profa. Dra. Lucélia Campelo Albuquerque Moraes

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

À minha família

Agradecimentos

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e pessoal e sem força de Deus nada seria possível.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes, a qual tive oportunidade em conhecer e, apesar da separação geográfica, admiro pelo profissionalismo, disponibilidade, entusiasmo e dedicação à ciência, e por toda atenção e carinho que sempre foi dispensado ao “*Max Doidinho*”. Minha gratidão por ter me aceito e acreditado nesta jornada, o programa finda, mas a admiração e amizade continuam.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França, pelo profissionalismo, paciência, sabedoria, conselhos e, sobretudo exemplo de dedicação à ciência.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia pelas oportunidades ofertadas e possibilidade na execução deste trabalho.

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

Ao coordenador local do Dinter, Prof. Dr. Eduardo Luzia França, pelos conselhos, estímulo e exemplo de perseverança.

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

À Equipe do Laboratório de Amebíase ICB/UFMG, em especial à minha orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes e ao Sr. João da Costa Viana, por terem disponibilizado inúmeras vezes material para realização do trabalho.

À equipe do laboratório de Imunomodulação e Cronobiologia, do ICBS/CUA/UFMT, pelo acolhimento e oportunidade para a realização dos experimentos.

Aos Colegas de Doutorado, que colaboraram durante todo o tempo de execução desse projeto; obrigado em especial à Lucélia que sem a colaboração e, sobretudo paciência, não teria os resultados obtidos.

Ao Victor Pena Ribeiro pela abnegação, desprendimento e dedicação, que por suas valiosas contribuições não poderia deixar de me esquecer.

À minha querida esposa Maria Fernanda, por sua paciência, incentivo e confiança em mim depositada e à nossa queridinha filha Helena, que com toda a doçura e carinho, foi a razão e o motivo maior para o término deste trabalho.

À minha mãe, Lujan Nazareth Chagas, por ter me dado o presente precioso da vida, e à minha irmã Stephanie e sua família Marcelo, João Marcelo e a pequena Lujan pelo constante incentivo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo, e que por ventura não foram citados.

Tenha sempre bons pensamentos
porque os seus pensamentos se transformam em suas palavras
Tenha boas palavras
porque as suas palavras se transformam em suas ações
Tenha boas ações
porque as suas ações se transformam em seus hábitos.
Tenha bons hábitos
porque os seus hábitos se transformam em seus valores
Tenha bons valores
porque os seus valores se transformam no seu próprio destino.

(Mahatma Gandhi)

Lista de Tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
1.1. <i>G. lamblia lamblia</i>	1
1.2. Ciclo biológico e Morfologia	3
1.3. Transmissão	6
1.4. Sintomas e Patogênese	8
1.5 Diagnóstico	10
1.6 <i>G. lamblia lamblia</i> e o sistema Imune	11
2. Justificativa	19
3. Objetivos	21
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	22
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	22
4. Material e Métodos	23
4.1. Sujeitos e aspectos éticos	24
4.2. Parasitos	24
4.3. Obtenção e separação de amostras de sangue periférico humano	25
4.4. Culturas de fagócitos com <i>G.lamblia</i>	25
4.5. Quantificação das citocinas	26
4.6. Incubação das citocinas com os fagócitos do sangue periférico	26
4.7. Atividade Funcional de fagócitos mononucleares	27
4.7.1. Dosagem de ânion superóxido	27
4.7.2. Ensaio de Fagocitose	27
4.7.3. Ensaio de Apoptose	28
4.7.4. Liberação de Cálcio Intracelular pelos fagócitos do sangue periférico humano	29
4.8. Análise Estatística	29
5. Resultados	30
5.1. Concentrações de citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17) liberadas em culturas de fagócitos MN na presença de <i>G. lamblia</i>	33

5.2. Liberação de ânion superóxido por fagócitos MN na presença de citocinas.....	34
5.3. Atividade microbicida dos fagócitos MN	35
5.4. Fagocitose	36
5.5. Índice de apoptose de fagócitos MN em presença, ou não, de <i>G. lamblia</i> , tratados, ou não, por citocinas.....	37
5.6. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados, ou não, por citocinas.	37
6. Discussão	38
7. Conclusões	46
ReferênciasBibliográficas	48
Anexos.....	60
Anexo 1 – IFNormações sobre o projeto	61
Anexo 2 – Parecer do comitê de ética.....	62
Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido	63

Lista de Tabelas

Tabela I. Concentração de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura pelos fagócitos na presença de trofozoítos de *Giardia lamblia* 33

Tabela II. Liberação de Ânion superóxido na interação entre Fagócitos MN e *Giardia lamblia* na ausência e presença de citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).....34

Lista de figuras

Figura 1. Índice de fagocitose na interação dos MN + *G. lamblia* na presença de citocinas..... 35

Figura 2. Atividade microbicida dos fagócitos MN tratados por citocinas (IFN- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) na presença de *G. lamblia*.....36

Figura 3. Índice de apoptose de fagócitos MN tratados por citocinas (IFN- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) durante interações com *Giardia lamblia*.....37

Figura 4. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados por IFN- γ TGF- β IL-4 e IL-17..... 38

Lista de abreviaturas

ANOVA = análise de variância

BSA = soro albumina bovino

CBA = Cytometric Bead Array

CP = cisteína proteinase

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

DNA = ácido desoxirribonucleico

ELISA = ensaio imunoenzimático

Ig = Imunoglobulina

IL-4 = Interleucina 4

IL-17 = Interleucina 17

IFN- γ = Interferon gama

MN = mononuclear

OMS = Organização Mundial da Saúde

NO = Óxido nítrico

PBS = solução salina tamponada

PCR = reação em cadeia da polimerase

ROS = espécies reativas de oxigênio

TYI-S33 = Trypticase Yeast Extract Iron Serum

TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β = fator de transformação do crescimento do tipo β

TNF = Fator de necrose tumoral

Th = célula T helper

Resumo

A *Giardia lamblia* (*G. lamblia*) é o agente causador da Giardíase, a qual é uma doença com alta prevalência no mundo, incluindo países desenvolvidos, constituindo a parasitose mais frequente. Por outro lado, as células fagocíticas e citocinas têm funções importantes na doença, mas os mecanismos de interação entre estes componentes durante infecções por protozoários ainda não estão totalmente elucidados. Desta forma o objetivo deste estudo foi analisar em sobrenadante de culturas de células mononucleares (MN) e *G. lamblia*: 1) os níveis das citocinas IFN- γ e TGF- β , IL-4 e IL-17; 2) a atividade funcional de células MN tratadas por estas citocinas na presença do parasito. Foram coletadas amostras de sangue de 60 doadores voluntários sadios para obtenção das células MN. Foram avaliadas no sobrenadante de cultura de células MN e *G. lamblia* as concentrações de IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17, a liberação de ânion superóxido, fagocitose, atividade microbicida, a apoptose e a liberação de cálcio intracelular pelas células MN. Observou-se que no sobrenadante de cultura de células MN e *G. lamblia* todas as citocinas avaliadas foram detectadas. As células MN, independente do tipo de citocinas, na presença de *G. lamblia* aumentaram a liberação do ânion superóxido. Os índices de fagocitose, atividade microbicida e os índices de apoptose foram maiores quando as células MN foram tratadas pelas citocinas. Os maiores índices microbicidas e de morte por apoptose foram observados quando as células MN foram tratadas pelo TGF- β . As citocinas IFN- γ e IL-4 aumentaram a liberação de cálcio intracelular por parte dos fagócitos MN. Estes dados sugerem que as citocinas desempenham um papel benéfico para o hospedeiro, por ativação de células MN na presença de *G.lamblia*, e que ocorre a morte da mesma durante o processo de fagocitose. A modulação da atividade funcional de fagócitos MN por IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 pode ser fundamental no controle da Giardíase.

Palavras chave: Fagocitose, Citocinas, Células Mononucleares, *Giardia lamblia*.

Abstract

G. lamblia is the agent that causes the giardiasis, which is a disease with significant prevalence in the world, including developed countries, and the most common parasitic disease. Phagocytic cells and cytokines appear to be important in giardiasis, but the influence of these cells and cytokines in protozoan infections is not totally elucidated. The aim of this study was to analyze the supernatant of cultures of MN cells with *G. lamblia* to determine: 1) the levels of the cytokines IFN- γ , TGF- β , IL-4 and IL-17; 2) the functional activity of MN cells after incubation with cytokines. Blood samples were collected from 60 volunteer donors healthy to obtain leukocytes. The levels of IFN- γ , TGF - β , IL-4 and IL-17 were quantified in cell culture supernatants -trophozoite. The superoxide release, phagocytosis, microbicide activity, apoptosis and intracellular calcium release were analyzed during interactions of MN phagocytes and *G. lamblia*. It was observed that in culture supernatant of MN cells and *G. lamblia* were detected all the cytokines evaluated. The MN cells, regardless of kind of cytokines, in the presence of *G. lamblia* increased superoxide release. The phagocytosis, microbicide activity and apoptosis rates were higher when the MN phagocytes were treated by cytokines. The highest microbicidal and apoptosis rates were observed when the MN cells were treated by TGF- β . The cytokines IFN- γ and IL-4 increased the release of intracellular calcium by MN phagocytes. The results suggest that cytokines play a beneficial role to the host by activation of MN cells for *G. lamblia*. They also suggest that during phagocytosis is occur death of *G. lamblia* the modulating the functional activity of phagocytes MN IFN- γ , TGF- β , IL-4 and IL-17 appear to be essential in controlling the Giardiasis.

Key Words: Phagocytosis, cytokines, MN cells, *Giardia lamblia*.

1. Introdução

1.1 *Giardia lamblia*

G. lamblia é um dos parasitos intestinais mais comuns em seres humanos, animais selvagens e animais domésticos. É um protozoário flagelado, do subfilo *Mastigophora*, que tem como habitat as partes altas do intestino delgado do homem. Atinge principalmente crianças, alcançando em algumas regiões do Brasil, uma prevalência maior que 20% na população IFNantil (Astiazaran et al. 2009). Indiscutivelmente é uma das parasitoses mais frequentes em países em desenvolvimento (Rivera et al. 2002). Particularmente, destaca-se a elevada prevalência em creches e orfanatos, uma vez que nesses ambientes é comum a transmissão direta de pessoa a pessoa por meios de mãos contaminadas (Savioli et al. 2006).

As Infecções causadas por helmintos e protozoários têm alta incidência, com grande repercussão na saúde do indivíduo, sendo uma preocupação constante na saúde pública (Geurden et al. 2010). *G. lamblia* é o protozoário patogênico mais frequente sendo encontrada tanto em sociedades tecnologicamente sofisticadas e industrializadas como em comunidades tradicionais dos países em desenvolvimento. *G. lamblia* foi observado pela primeira vez por Antonie Van Leewenhoek em 1681 quando notou “animalúnculos móveis” em suas próprias fezes e foi descrito detalhadamente em 1859 por Lambl, sendo então denominado *Cercomonas intestinalis* (Sedinová et. Al. 2003).

Atualmente a classificação mais aceita para *Giardia spp.* tem como base as características morfológicas e as espécies descritas são: *G. agilis*, parasito de anfíbios, *G. muris*, roedores, *G. ardeae*, parasito de pássaros, *G.lamblia*, esta última, também denominada *duodenalis* ou *G. intestinalis* (Apelbee et al. 2005). Sabe-se hoje que somente a *G. lamblia* parasita o homem e

diversas espécies de mamíferos, o que indica o grande potencial zoonótico deste protozoário (Lalle et al. 2005). Com as técnicas de biologia molecular, e consequente caracterização dos exemplares do parasito, tem-se confirmado a heterogeneidade e consequente melhor entendimento da taxonomia e potencial zoonótico de *G. lamblia* (Van Keulen et al. 2002).

O microrganismo possui distribuição mundial e é de grande importância epidemiológica e clínica por sua alta prevalência (Adam, 2001). *G. lamblia* é comumente aceito como importante agente causador de zoonose (Ali & Hill, 2003), estimado em cerca de 2.800.000 casos por ano no mundo (Lloyd et al. 2002). A giardíase é referida com uma enfermidade parasitária re-emergente devido a sua crescente e reconhecida importância em surtos de doenças diarreicas em creches e em epidemias transmitidas pelo consumo de água contaminada (Read et al. 2002; Monis et al. 2003; Sulaiman et al. 2004; Hunter & Thompson, 2005).

1.2 Ciclo biológico e Morfologia

G. lamblia possui ciclo de vida de dois estágios (Figura 1). As formas IFNectantes são os cistos que são excretados nas fezes e ingeridos pelo hospedeiro. A exposição aos ácidos do estômago e aos sais biliares no intestino estimula a transformação dos cistos em trofozoíto (forma parasitária). Os trofozoítos de *G. lamblia* possuem forma de pêra, medindo aproximadamente 12 a 15 μm x 5 a 9 μm . O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral), e um disco ventral. O trofozoíto adere-se, desenvolve-se e coloniza a superfície da mucosa do intestino delgado onde se multiplica assexuadamente por divisão binária (Adam, 2001). A medida em que os trofozoítos passam através do intestino, eles se encistam e são excretados nas fezes.

Introdução

O ciclo biológico é direto, e se inicia pela ingestão de cistos presentes em água ou alimentos contaminados. Mediante exposição ao suco gástrico, pH ácido e enzimas pancreáticas, ocorre ruptura do cisto na região anterior do intestino delgado (duodeno), liberando um excizoíto que rapidamente se divide em 4 trofozoítos (Bernander et al. 2001). Os trofozoítos liberados iniciam um processo de multiplicação por fissão binária nas criptas do duodeno e nas regiões superiores do jejuno. Eles colonizam diferentes porções do intestino, entretanto, a maioria adere às microvilosidades das células epiteliais da porção inicial do intestino. Não ocorrem estágios intracelulares no ciclo de vida da *Giardia* spp. e normalmente, não há invasão de tecidos epiteliais. A ação dos sais biliares e dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro, responsáveis pelo destacamento dos trofozoítos das mucosas, induz o encistamento dos mesmos possibilitando, a liberação dos cistos juntamente com as fezes no meio ambiente (Ortega & Adam, 1997).

O processo de encistamento inicia-se pela ativação de genes específicos por estímulos externos, seguida pela biogênese de organelas secretoras que realizam a síntese, empacotamento, transporte e liberação dos constituintes da parede cística, e possibilitam a sobrevivência dos cistos por até 8 meses no meio ambiente (Zajac et al. 2002) e três meses em água a 4°C (Meyer, 1990). Além disso, condições específicas como pH próximo a 7,8, sais biliares e ácidos graxos são essenciais para a promoção do encistamento (Adam, 2001). Os cistos são detectados nas fezes uma a duas semanas após a infecção. Os trofozoítos podem ser eliminados pelas fezes, mas raramente sobrevivem por um período significativo fora do hospedeiro (Zajac et al. 2002).

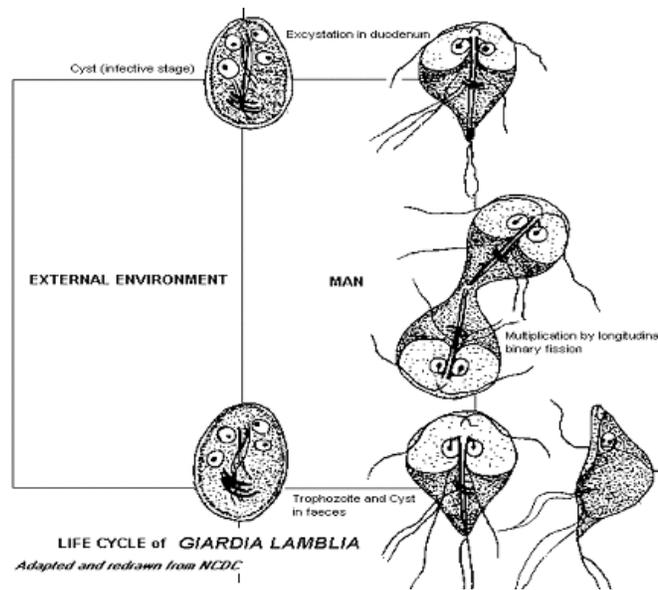


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia* spp.

Fonte: (ADAM, 2001)

Morfológicamente, o parasito se apresenta por duas formas evolutivas denominadas de cisto e trofozoíto. O cisto é a forma infectante, medindo de 8,0 a 12,0 μm de comprimento por 7,0 a 10,0 μm de largura, circundado por uma parede de 0,3 μm de espessura e possui dois a quatro núcleos, corpos basais e elementos estruturais do disco ventral (Thompson et al. 1993). É encontrado, frequentemente, em fezes formadas, apresentando alta resistência no ambiente e permanecendo viável por vários meses, principalmente, em locais úmidos.

O trofozoíto representa a forma vegetativa do parasito. É bilateralmente simétrico e dorso-ventralmente achatado, medindo em torno de 12,0 a 15,0 μm de comprimento e 5,0 a 9,0 μm de largura. Apresenta dois núcleos de tamanhos iguais na parte anterior, dois axonemas, um disco suctorial ou adesivo ventral, dois corpos médios e quatro pares de flagelos (Lane & Lloyd, 2002). Tem a forma de uma pera e apresenta simetria bilateral, com uma extremidade mais larga que se vai adelgaçando. A face dorsal é lisa e convexa, enquanto a ventral é côncava, apresentando uma

estrutura que funciona como uma ventosa, denominada disco suctorial (Thompson & Monis, 2004). O disco suctorial, por sua vez, tem a função de fazer a adesão dos trofozoítas de *Giardia* spp. à mucosa intestinal. Embora os mecanismos da adesão ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que a participação de proteínas contráteis, presentes nos discos, exerce importante papel nesse aspecto (Rocha, 2004).

Dois núcleos vesiculosos com um grande cariossoma cada, ocupando cerca de 2/3 dos mesmos, podem ser observados na porção anterior, na matriz citoplasmática, aparentemente sobrepostos à projeção do disco suctorial quando observadas em posição dorso ventral. Na parte mediana, podem ser visualizadas duas estruturas em forma de “vírgula”, denominadas corpos medianos. O corpo mediano contém microtúbulos e proteínas contráteis e sua função não está esclarecida. Oito flagelos emergem de blefaroplastos situados próximo ao núcleo, exteriorizando-se em dois anteriores, dois medianos, dois posteriores e dois caudais (Thompson & Monis, 2004). Os movimentos flagelares podem ser facilmente observados em preparações a fresco, onde se nota uma movimentação bastante característica (Jiménez et al. 2004).

1.3 Transmissão

A IFNecção do hospedeiro por *G. lamblia* pode ocorrer tanto pelo contato direto via oro-fecal; ou por via indireta através do consumo de alimento ou água contaminados. Há evidências circunstanciais da giardíase humana associada com água contaminada (Xiao et al. 2006), a exposição e manejo de animais domésticos IFNectados, particularmente bezerros (Thompson, 2004).

Embora os trabalhadores de propriedades rurais e as pessoas que as visitam possam contrair giardíase pelo contato direto, a transmissão zoonótica indireta, de origem bovina, através da água tem sido considerada por muito tempo como a fonte mais importante da IFNecção zoonótica humana (Monis & Thompson, 2003).

A transmissão desses parasitos através do consumo de água é de interesse crescente, porque essa via de IFNecção tem o potencial de atingir um grande número de indivíduos (Appelbee et al. 2003). Formas IFNectantes desses protozoários podem chegar a fontes de água utilizada para consumo humano através do escoamento das pastagens de bovinos (contaminação de fontes de água para abastecimento e consumo humano, águas superficiais e recreacionais), com diversos casos de epidemias relatadas no mundo. (Thompson, 2004; Xiao et al. 2006).

O consumo de água não tratada ou filtrada, representa risco significativo para giardíase, estando os surtos ligados ao consumo de água não filtrada ou proveniente de sistemas subterrâneos contaminados por fontes superficiais (Hoque et al. 2002; Olson et al. 2002; Thompson, 2004). Na forma cística, o parasito se mostra altamente resistente à cloração e ozonização, sendo a filtração o único processo que garante a remoção dos cistos (Lane & Lloyd, 2002). Dessa forma, a água se torna importante veículo de transmissão de *G. lamblia*, constituindo sério problema em saúde pública (Thompson, 2004).

A transmissão direta, pessoa a pessoa, constitui outra via eficiente de IFNecção, principalmente, em instituições coletivas como creches, orfanatos, entre pessoas da mesma família, quando as condições de higiene são deficientes. Ela pode ser efetiva com 1 a 10 cistos, mesmo existindo divergências expressivas entre os isolados de *G. lamblia*, em relação à virulência e diversidade antigênica (Ortega & Adam, 1997).

Os trofozoítos, usualmente, não estão envolvidos na transmissão de *G. lamblia*, embora a ocorrência da IFNecção por essa forma seja possível. Estudos experimentais relatam que a forma trofozoítica mostra-se sempre IFNectante, enquanto cistos de diferentes pessoas ou animais, ou até mesmo aqueles eliminados em diferentes dias, podem apresentar IFNectividade variada (Hewlett et al., 1982).

1.4 Sintomas e Patogênese

A marca característica de Infecções por *Giardia* spp. é a ampla gama de apresentação dos sintomas. A maioria dos indivíduos IFNectados apresenta alguns sinais e sintomas de IFNecção. Outros hospedeiros exibem cólicas abdominais, náuseas, distensão abdominal, perda de peso, vômitos, má absorção e diarreia aguda ou crônica (Cotton et al. 2011). Apesar da variação clínica da giardíase em ativar Infecções, a giardíase não causa IFNlamação evidente do epitélio intestinal (Oberhuber & Stolte, 1990), exceto em casos de doença prolongada (Hanevik et al. 2007).

Vários trabalhos procuram identificar a causa subjacente de variação de sintomas, incluindo carga parasitaria (Petri et al. 2009), giardíase associada à IFNecção (Ward, 2009; Read et al. 2002), variação antigênica do parasito (Gottstein et al. 1990), dose IFNectante (Rendtorff, 1954) e o estado imunológico do hospedeiro (Hanevik et al. 2007), atualmente, sabe-se que uma multiplicidade de fatores conduzem as manifestações clínicas da doença.

Os sintomas associados com a IFNecção por *Giardia* spp. têm sido bem documentados, entretanto, os mecanismos celular e molecular subjacentes que conduzem à doença não são bem compreendidos. A patogênese da *Giardia* spp. não é claramente compreendida, embora pareça envolver a atrofia das vilosidades e danos aos microvilos. Essas alterações são em parte

correlacionadas com deficiências enzimáticas na superfície da mucosa e decréscimo na absorção, que retornam ao nível normal de atividade quando a IFNecção se resolve (Thompson et al. 2000).

As células epiteliais expostas a *Giardia* spp. exibem expressão aumentada de genes de resposta ao estresse levando a diminuição da expressão de genes proliferativos (Roxstrom-Lindquist et al. 2005), rearranjo de actina (Teoh et al. 2000), aumento da permeabilidade intestinal (Troeger et al., 2007; Panaro et al., 2007), e aumento da apoptose (Panaro et al. 2007; Chin et al. 2002). Além disso, quando expostos ao parasito in vitro, as células epiteliais secretam citocinas que são quimiotáticas para as células imunológicas, incluindo macrófagos (Roxstrom-Lindquist et al. 2005). O recrutamento de macrófagos para o local de IFNecção sugere que estas células têm uma função importante no controle do parasito.

A giardíase é caracterizada por ampla variação de sintomas (Adam, 2001). Em muitos indivíduos, a IFNecção permanece assintomática ao passo que em outros exibem sintomas graves. Os mais proeminentes sinais clínicos da giardíase são cólicas abdominais, náuseas seguidas por diarreia, possivelmente como consequência da má-absorção e perda de peso (Müller & Von Allmen, 2005). A má-absorção de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitamina A e B12, a perda de peso, aliadas à frequência e duração da IFNecção e a oportunidade de reIFNecção (Thompson et al. 1993), têm sido, frequentemente, identificadas como os principais fatores associados ao atraso no desenvolvimento físico e cognitivo entre crianças (Goldin et al. 1990).

Estudos indicam que as Infecções por *G. lamblia* são processos patofisiológicos complexos. Um destes processos é a alteração da permeabilidade epitelial, resultado de efeitos citopáticos diretos induzidos pelos produtos do parasito (Buret et al. 2002). O aumento da permeabilidade leva a resposta IFNlamatória, alterando a digestão, absorção de nutrientes (dissacarídeos, gorduras e vitaminas), destruição de vilosidades e deficiência de dissacaridases,

podendo resultar no aumento de antígenos no lúmen intestinal, responsáveis por desordens alérgicas (Scott et al. 2002).

Fatores ligados ao hospedeiro como condição imunológica, idade, estado nutricional e ao parasito, como virulência, patogenicidade, número de cistos ingeridos e a presença de Infecções concomitantes determinam, em conjunto, o curso clínico da IFNecção, ficando evidente a ocorrência da giardíase em imunodeficientes, desnutridos ou em indivíduos muito jovens (Boreham, 1991).

No Brasil, a população de nível socioeconômico mais baixo apresenta uma maior prevalência de doenças intestinais parasitárias, sobretudo inclui-se a giardíase, isso devido às precárias condições de saneamento básico, habitação e estado nutricional. Em decorrência dos efeitos deletérios à saúde dos indivíduos e, em especial as repercussões econômicas, constata-se uma divergência entre o êxito alcançado nos países mais desenvolvidos e comparados a países em desenvolvimento como o Brasil (Ludwing et al. 1999).

1.5 Diagnóstico

O método convencional de diagnóstico inclui a técnica de concentração fecal para a observação de cistos de *G. lamblia*. Esse é o método mais usado na rotina laboratorial. Entretanto, a microscopia óptica consome bastante tempo do analisador e requer experiência para identificação dos cistos dos parasitos. Em adição, o limite de detecção dessas técnicas é sempre relatado como baixo. Métodos baseados em técnicas imunológicas foram desenvolvidos para uso

diagnóstico em amostras fecais (Aziz et al. 2001; Cirak & Bauer, 2004). Todavia, a variabilidade antigênica contida em isolados desses protozoários pode proporcionar resultados falsos negativos, e há relatos conflitantes sobre a sensibilidade dos métodos imunoenzimáticos comparados aos de microscopia óptica (Hanson & Cartwright, 2001).

Os métodos baseados na detecção do DNA (Reação em Cadeia da Polimerase) foram introduzidos e tem sido descritos como muito sensíveis para detecção desses patógenos em amostras fecais (Morgan et al. 1998). Essa tecnologia ainda é de custo alto para ser usada como teste de rotina, embora possua sensibilidade analítica e diagnóstica superior aos outros métodos (Macglade et al. 2003).

1.6 *Giardia lamblia* e o sistema Imunológico

A resposta imunológica para *G. lamblia* envolve uma série de mecanismos, dentre estes, mecanismos inespecíficos como células fagocíticas, a produção de metabólitos ativos do oxigênio, defensinas e enzimas líticas. Também ocorre a ativação da resposta imunológica adaptativa que envolve a participação de IIFNócitos T e IIFNócitos B (Roxtrom et al. 2006).

Na giardíase, os IIFNócitos TCD4⁺ provavelmente participam do controle da IFNecção devido ao aumento de secreção de citocinas (Carlson et al. 1987; Heyworth et al. 1987; Venkatesan et al. 1996; Djamiatun & Faubert, 1998; Singer & Nash, 2000), enquanto que os IIFNócitos TCD8⁺ participam dos processos de destruição tecidual do hospedeiro (Scott et al. 2004).

A importância dos IIFNócitos TCD4⁺ no controle da giardíase foi primeiramente demonstrada por Stevens et al. (1978). Os autores observaram que camundongos depletados

desenvolvem Infecções prolongadas, enquanto que a transferência adotiva de IIFNócitos T controla a IFNecção. A depleção de IIFNócitos TCD4⁺ causa a prolongação da IFNecção e exacerbação da eliminação de cistos (Heyworth et al. 1987).

A atuação das células B através da produção de anticorpos específicos também é importante para a eliminação efetiva da *G. lamblia spp.* do lúmen intestinal, sendo a imunoglobulina A do tipo secretória (SIgA) o isotipo mais abundante em mucosas e requerido para o controle e eliminação do parasito no intestino delgado (Snider & Underdown, 1986; Snider et al. 1988; Skea & Underdown, 1991; Langford et al. 2002). Cabe ressaltar que em indivíduos agamaglobulinêmicos ocorre aumento na incidência de giardíase, sugerindo a importância da imunidade humoral na eliminação do parasito (Hughes et al. 1971; Ament & Rubin, 1972; Hermans et al. 1976).

A presença de anticorpos anti-*G. lamblia* no soro de humanos IFNectados também foi relatada (Ridley & Ridley, 1976). Embora esses indivíduos produzam anticorpos circulantes específicos para o parasito, o papel desses anticorpos na imunidade protetora e os mecanismos que levam a sua indução não estão completamente elucidados (Heyworth, 1992). Entretanto, acredita-se que possam atuar na resistência à IFNecção pela fixação de complemento e/ou pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (Nash & Aggarwal, 1986; Belosevic et al., 1994; Daniels & Belosevic, 1994), com participação de IgG específica para o parasito (Smith et al., 1983).

Vários modelos experimentais mostram a presença de anticorpos IgA, IgG e IgM específicos à *G. lamblia spp.* nas secreções intestinais de camundongos IFNectados (Heyworth, 1986; Snider & Underdown, 1986; Skea & Underdown, 1991; Heyworth, 1992; Abdul & Faubert, 2008). Esses anticorpos atuam diretamente no controle da giardíase, pois se ligam aos

antígenos de superfície presentes no disco adesivo, interferindo na aderência dos trofozoítos na mucosa intestinal além de promover a imobilização e aglutinação dos trofozoítos (Heyworth, 1986; Langford et al., 2002). Também estudos sugerem que a alta suscetibilidade para *G. lamblia* ocorre no caso de deficiência de IgG e de IgA (Faubert, 2000).

As células dendríticas (DC) podem estar criticamente envolvidas na indução de anticorpos anti-*G. lamblia spp.* Estas células são capazes de atingir com as suas saliências celulares o lúmen e absorver o antígeno processá-lo e apresentar peptídeos específicos para LINFócitos T. DC são ativadas através de ligantes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores Toll-like (TLR), lectinas do tipo C, e de ligação de nucleotídeo de domínio de oligomerização (NOD) -como receptores (NLRs), que são essenciais para a indução de imunidade celular específica (Ueno et al. 2007).

Infecção por *G. lamblia* também induz resposta imunológica para alérgenos, explicando, em parte, o aumento da tendência a urticárias e de alergias a alimentos em pacientes positivos para este parasito (Jiménez et al. 2004).

Além de anticorpos, as citocinas também estão envolvidas com a resposta imunológica do hospedeiro. Estas proteínas estimulam a reação inflamatória e a hematopoese, além da síntese de proteínas de fase aguda. Na giardíase, observa-se aumento de IL-6 e de IFN- γ por LINFócitos T CD4 + (Ebert, 1999). Alguns autores têm sugerido que, em resposta ao antígeno de *G. lamblia spp.*, as células T liberam citocinas específicas, enquanto mastócitos liberam mediadores celulares (Singer & Nash, 2000).

O papel das citocinas está relacionado diretamente com o perfil de imunidade e de acordo com estímulo pode determinar respostas imunológicas diferenciadas frente ao parasito. A IL-10 e TGF- β são produzidas em níveis elevados em pacientes infectados por protozoários (Bayraktar

et al. 2005). Essas citocinas têm atividade imunomoduladora na IFNecção, limitando a resposta IFNlamatória. De uma forma geral, as interleucinas IL-4 e TGF- β , parecem suprimir a resposta imunológica celular, podendo em algumas Infecções determinar quadros sintomáticos (Bansal et al. 2005).

As citocinas IL-6 e IL-5 também contribuem para a resposta humoral. Estas citocinas são produzidas por IIFNócitos T, e participam na indução e diferenciação do crescimento tanto de IIFNócitos B como IIFNócitos T. A IL-5 estimula a proliferação e diferenciação de precursores de eosinófilos, estimula a sua desgranulação e produção de reativa de compostos oxigenados. Ela exerce efeito quimiotático para eosinófilos, induzindo eosinofilia no hospedeiro (Weltman, 2000).

Outra citocina secretada pelos IIFNócitos T é IL-13, que é capaz de aumentar a proliferação de células B, e exerce efeito sobre monócitos. Seu papel fisiológico importante é regular resposta antiparasitária. TNF (secretada por macrófagos) e IFN- γ (secretada por células T e NK) contribuem para o aumento expressão de óxido nítrico sintase (INOS). IFN- γ , TNF- α e IL-1 induzem a geração óxido nítrico por macrófagos.

Os mediadores IFNlamatórios liberados podem causar danos ao parasito, aceleram o peristaltismo intestinal e facilitam a erradicação do parasito pela produção de muco no intestino, o que é indispensável para a remoção do parasito (Hawrelak, 2003).

A resposta imunológica durante a IFNecção por *G. lamblia* em humanos é caracterizada pela IFNlamação das mucosas (Hautus et al., 1987; Nash et al., 1987; Langford et al., 2002). As citocinas IL-6 e TNF- α são necessários para o controle precoce da giardíase (Zhou et al., 2003; Zhou et al., 2007; Li et al., 2004). A citocinas IL-6, IL-5, IFN- γ e IL-2 são mais elevadas em

pacientes IFNectados com *G. lamblia*, sugerindo um papel protetor destas citocinas frente a *G. lamblia spp.* (Bayraktar et al. 2005; Matowicka et al. 2009).

Estudos têm mostrado a participação de mastócitos na resposta imunológica para *G. lamblia* (Erlich et al. 1983; Hardin et al. 1997; Venkatesan et al. 1997; Li et al. 2004). Os mastócitos têm um papel importante para Infecções de *G. lamblia spp.*, produzem grandes quantidades de IL-6, sendo sugerido que os mesmos constituem fonte de IL-6 durante a IFNecção (Li et al. 2004).

Também a administração oral de *G. lamblia* em camundongos estimula resposta de células Th2, o que pode levar a alterações histológicas intestinais caracterizadas por IFNitração de eosinófilos com hiper celularidade e descamação enterocítica (Lee et al. 2012).

Estudo do epitélio intestinal humano revela que a IFNecção por *G. lamblia* resulta em considerável alteração do perfil celular e outros componentes, incluindo citocinas (Roxstrom-Lindquist et al. 2005). O contato de *G. lamblia* às células epiteliais resulta também na liberação de enzimas metabólicas (arginina desaminase, carbamoiltransferase ornitina e enolase) (Ringqvist et al. 2008).

Na giardíase o parasito permanece no lúmen intestinal onde ele adere às células epiteliais. Uma vez que as células TCD4 + estão envolvidas na proteção para *G. lamblia* (Singer & Nash, 2000), a IFNecção crônica pode resultar de apresentação de antígenos insuficiente com falha na imunidade celular protetora. Em modelos experimentais, a produção de citocinas estimuladas pela *Giardia spp.* revela que o aumento da secreção de IL-4 seguida por redução desta citocina pode gerar aumento na produção de IFN- γ . Além disso, a secreção de IL-5 também foi observada juntamente com a produção de IFN- γ , o que reforça o envolvimento destas citocinas no controle da *G. lamblia* (Singer & Nash, 2000).

O IFN- γ tem sido relacionado com um aumento na produção de metabólitos ativos do oxigênio pelos macrófagos em Infecções por *Giardia spp.* (Byrd et al. 1994; Holland et al. 2000), e estudos sugerem que a elevada produção de IFN- γ pelos fagócitos pode contribuir para o controle e eliminação da Infecção por *G. lamblia* (Jimenez, 2004).

Os macrófagos/monócitos são células mononucleares que estão envolvidos em respostas IFNamatórias, e são essenciais para a defesa do hospedeiro. O recrutamento de fagócitos mononucleares em tecidos intestinais é um processo de múltiplos passos, envolvendo o egresso da medula óssea até a circulação, a migração através de tecidos do hospedeiro, e migração transepitelial (Chin & Parkos, 2007; Summers et al. 2010; Kolaczowska & Kubes, 2013).

Além disso, múltiplos mediadores são conhecidos por promover acúmulo de fagócitos MN nos tecidos. Durante respostas IFNamatórias agudas, o fator de estimulação de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) promove aumento destas células na medula óssea e como consequência aumento do número fagócitos MN circulantes (Wengner et al. 2008; Mei et al. 2012). Também a produção de interleucina 17A (IL-17A) por células do tecido IFNectado tem sido relacionada com o aumento dos níveis de GM-CSF e de fagócitos MN (Mei et al. 2012; Schwarzenberger et al. 2000; Semerad et al. 2002).

O recrutamento de macrófagos para o local da Infecção sugere que essas células têm uma função de controle durante a Infecção pelo parasito, porém na giardiase humana, não está claro como macrófagos respondem às citocinas durante a Infecção e, subsequentemente, como estas proteínas modulam a resposta imunológica 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). A destruição do microrganismo, após a fagocitose, pode ser mediada por dois mecanismos: metabolismo oxidativo com produção de metabólitos ativos do oxigênio (Mundi et al. 1991), ou liberação de enzimas lisossômicas (Segal & Soothill 1983). A produção de reativos do oxigênio durante a fagocitose exerce importante atividade microbicida (Mundi et al. 1991; Honorio-França 2001).

Por outro lado, excesso de IFN α e ativação de fagócitos mononucleares podem contribuir para várias desordens IFN α lamatórias gastrintestinais. Estudos indicam que as Infecções por *Giardia ssp.* atenuam o recrutamento de fagócitos MN para o tecido (Wengner, et al. 2008; Eash et al. 2010), em um processo que pode ser iniciada por meio da produção de IL-17 (Mei et al. 2012; Schwarzenberger et al. 2000) sugerindo a participação desta citocina durante a IFN α ecção pelo parasito.

Na literatura, diferentes modelos experimentais relatam a importância de IL-17 após a IFN α ecção (Grit et al. 2014). A função da IL-17 possivelmente está ligada a estimulação da produção de mucinas e defensinas (Ishigame, 2009; Chen, 2003), que são mediadores importantes de defesa durante a IFN α ecção por *G. lamblia* (Müller & Von Allmen, 2005).

Apesar de avanços em pesquisas que demonstram os mecanismos fisiopatogênicos da *G. lamblia*, ainda não está claro o perfil da imunidade celular. Isto é, o papel dos fagócitos na giardiase suas interações com citocinas não está totalmente elucidado.

A literatura tem reportado a ação imunoprotetora de fagócitos na giardiase, sendo evidenciada a capacidade de fagocitose dos macrófagos em relação a *G. lamblia* (Hill & Pearson, 1987), que parece sofrer IFN α luência de opsoninas para aderência, ingestão e morte de

trofozoítos de *G. lamblia*, uma vez que esses fagócitos aumentam sua capacidade de ingestão e morte do *G. lamblia* na presença de imunoglobulinas e do proteínas C3 e C4 do sistema complemento (França-Botelho et al. 2006).

No entanto, o mecanismo efetor de ativação celular, bem como o funcionamento dessas vias sinalizadoras de ativação destas células durante interações com parasito, ainda não está claro. Embora as células fagocíticas desempenharem importante função na giardíase, os efeitos imunomoduladores de citocinas sobre fagócitos nas Infecções por protozoários ainda é parcialmente compreendido.

2. Justificativa

Na Ásia, África e América Latina, cerca de 280 milhões de pessoas têm giardíase e 500.000 novos casos são relatados cada ano, sendo considerada uma das principais Infecções por parasitos em humanos de todo mundo (Eckmann, 2003)

Fatores imunológicos e não-imunológicos são importantes na giardíase (Roxstrom et al. 2006). Em IFNecção por patógenos entéricos ocorre a liberação de quimiocinas e citocinas no epitélio intestinal do hospedeiro, no entanto, este processo ainda não está elucidado em Infecções por *G. lamblia*.

A liberação de citocinas durante a IFNecção por *G. lamblia* pode variar entre indivíduos, o que pode ser explicado devido à variação antigênica de proteínas de superfície presentes no protozoário, bem como devido à duração e severidade da IFNecção. Além da liberação de citocinas na giardíase, o papel das células mononucleares e sua capacidade fagocítica estão relacionados à proteção para *G. lamblia*. Fagócitos são importantes na defesa para a giardíase, pois são capazes de ingerir trofozoítos de *G. lamblia* (Hill e Pearson, 1987; França-Botelho et al. 2006) indicando que estas células são importantes na proteção da giardíase.

Assim trabalhos têm sido desenvolvidos buscando elucidar os mecanismos imunológicos que ocorrem durante a giardíase, mas estudos que incluem sinalização intracelular e interação de células do hospedeiro com imunomoduladores, como as citocinas, bem como os mecanismos de ativação intracelular durante a IFNecção ainda são parcialmente compreendidos. É provável que alterações durante a IFNecção por *G. lamblia* possam interferir nos mecanismos imunológicos do hospedeiro, alterando as interações entre citocinas e células. Assim, este trabalho se justifica pelo fato que visa compreender as interações entre fagócitos e *G. lamblia*, bem como as possíveis ações imunomoduladoras de citocinas sobre a atividade funcional destas células durante as Infecções pelo parasito.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Verificar a concentração de citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 em sobrenadante de cultura de fagócitos mononucleares do sangue periférico humano na presença de *G. lamblia* e analisar a atividade funcional destes fagócitos tratados por estas citocinas na presença do parasito.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar concentração de citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 em sobrenadante de culturas de fagócitos mononucleares do sangue periférico humano na presença de *G. lamblia*;
- Verificar os efeitos imunomoduladores de citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 sobre a liberação do ânion superóxido pelos fagócitos mononucleares na presença de *G. lamblia*;
- Avaliar os índices de fagocitose, atividade microbicida e de apoptose durante as interações entre fagócitos tratados por citocinas e *G. lamblia*;
- Verificar os efeitos de citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 sobre a liberação de Ca²⁺ intracelular pelos fagócitos mononucleares.

4. Material e Métodos

4.1. Sujeitos e aspectos éticos

Participaram deste estudo 60 indivíduos clinicamente saudáveis, do sexo masculino com idade entre 18 a 35 anos. Todos os sujeitos foram voluntários, sendo IFNormados no momento da doação que o sangue se destinava a um trabalho de pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Campus Araguaia da Universidade Federal de Mato Grosso sob protocolo nº 684.338 (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 IFNormados e o material somente foi coletado ou utilizado, sob expresse consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – Anexo 2), conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP). Os experimentos foram realizados dentro de normas de biossegurança.

4.2. 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, num período de 2 a 5 dias. Antes dos experimentos, os tubos contendo as culturas de trofozoítos de *G. lamblia* foram centrifugados a 250 g durante 5 minutos a 4°C, posteriormente foram lavados e ressuspendidos no meio de cultura 199. A capacidade de sobrevivência dos parasitos no meio 199 foi determinada pela incubação de 10⁶ trofozoítos/mL de meio 199, e também com o meio TYI-

S-33 a 37°C. Após duas horas de incubação, a mobilidade dos flagelos e o movimento do trofozoíto foram medidos para determinar a viabilidade do parasito.

4.3. Obtenção e separação de amostras de sangue periférico humano

Foram coletadas amostras de sangue periférico, de aproximadamente 8 ml de sangue, em tubos, contendo EDTA (Marca Top Glass). Todas as amostras foram processadas imediatamente.

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-Upsalla) por 30 minutos a temperatura ambiente. O anel rico em fagócitos MN foi retirado e lavado por três vezes em meio 199 (Sigma, St. Louis USA). A seguir os fagócitos MN foram contados em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml.

As células foram utilizadas para os ensaios de liberação de ânion superóxido, de fagocitose, de atividade microbicida, de apoptose e de Ca^{2+} intracelular.

4.4. Culturas de fagócitos com *G. lamblia*

Após a separação dos fagócitos MN do sangue, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em meio à cultura RPMI (Sigma, St. Louis USA), acrescidas de 10% de soro bovino fetal. A seguir, as células (2×10^6 cels/ml) foram incubadas com *G. lamblia* (4×10^4 parasitos/ml) durante duas horas a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram centrifugadas por 10 min. a 160 x g e os sobrenadantes foram reservados para quantificação de citocinas.

4.5. Quantificação de citocinas

As concentrações de citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 presentes no sobrenadante de culturas de *G. lamblia* e células MN foram avaliadas pelo Kit “Cytometric Bead Array” (CBA, BD Bioscience, USA). As análises dessas citocinas foram realizadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados com o software FCAP Array e os resultados foram expressos em pg/dl (Fagundes et al, 2015).

As concentrações de TGF- β presentes nas culturas de *G. lamblia* e células MN foram avaliadas pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Para as concentrações de TGF- β , foi utilizado um kit da Enzo Life Science (UK). As análises foram realizadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Os resultados foram calculados utilizando curva padrão e os resultados foram expressos em pg/dl. O protocolo seguiu as instruções do fabricante.

4.6. Incubação das citocinas com os fagócitos do sangue periférico

Foi realizada a incubação durante 120 minutos dos fagócitos MN e citocinas visando modular a atividade funcional destas células. Para cada ensaio, foi realizado por tempo similar um controle dos experimentos utilizando fagócitos MN (2×10^6 cels/ml) incubados somente com meio de cultura, dependendo do tipo de ensaio em meio 199 ou PBS na ausência de citocinas. A concentração de citocinas foi de 100 ng/ml, de acordo com protocolo previamente estabelecido (Fagundes et al. 2013).

4.7. Atividade Funcional de fagócitos mononucleares

4.7.1. Dosagem de ânion superóxido

A modulação dos fagócitos MN do sangue por citocinas foi verificada por meio da liberação de ânion superóxido, utilizando-se o cromógeno Ferricitocromo C, segundo o método de Pick & Mizel em 1981, e adaptado por Honório-França et al. (1997). Em presença do ânion superóxido, o ferricitocromo C sofre oxidação passando a ferrocitocromo C. Essa mudança colorimétrica é detectável em espectrofotômetro com filtro de 620nm. As suspensões de células MN (2×10^6 /ml) foram misturadas com trofozoítos de *G. lamblia* (4×10^4 parasitos/ml), incubadas e agitadas durante 120 minutos a 37° C. A suspensão foi ressuspensa em 0.5 ml de PBS glicosado contendo ferricitocromo C (Sigma, St. Louis USA) concentração de 2mg/ml. Um controle contendo somente células foi realizado paralelamente para verificação da liberação espontânea do ânion superóxido pelas células MN. Após a cultura, as suspensões foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços com um volume de 100 μ l por poço e deixadas em estufa a 37° C durante 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para placa com filtro de 550 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada por meio da seguinte relação: Concentração O^{2-} (nmol) = $DO/6.3 \times 100$. (Pick & Mizel, 1981)

4.7.2. Ensaio de Fagocitose e atividade microbicida

Foram misturadas as suspensões de células MN (2×10^6 células/ml) com trofozoítos de *G. lamblia* (4×10^4 parasitos/ml), seguido de incubação por duas horas a 37° C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a $160 \times g$ sob refrigeração a 4° C. O "pellet" foi corado com 200 μ l de alaranjado de acridina (Sigma, St. Louis USA - concentração 14,4 mg/ml) por 1

minuto e, a seguir, foi ressuspendido em meio 199 (Sigma, St. Louis USA), centrifugado e lavado mais duas vezes. Os resultados foram obtidos pela análise em microscópio de fluorescência.

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 fagocitados pelas células MN, porém, com coloração na cor verde, foram considerados vivos (França et al. 2011). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.7.3. Ensaio de Apoptose

Para o ensaio de apoptose foi utilizado o Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (Sigma, St. Louis USA), sendo o ensaio realizado de acordo as instruções do fabricante. Suspensões de fagócitos MN de sangue foram pré-tratados ou não citocinas e incubadas com *G. lamblia* durante um período de tempo de 2 horas em estufa (37°C-5% de CO₂). 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-*G. lamblia* 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 Ascent™ FL Microplate, USA).

4.7.4. Liberação de Cálcio Intracelular pelos fagócitos do sangue periférico humano

A liberação de cálcio intracelular foi realizada utilizando o cromógeno Fluo-3 (Fluo3-Acetoxymethyl, AM-Sigma, St. Louis USA). A aquisição e análises dos resultados foram realizadas no Citômetro de Fluxo (FacsCalibur, BD Bioscience, USA). Suspensões de células MN do sangue foram pré-incubadas com as citocinas, conforme descrito anteriormente. A suspensão foi centrifugada duas vezes (160 x g, 10 min, 4° C) ressuspendida em PBS contendo BSA (5mg/ml) e incubadas com 5 µL de Fluo-3 (1µg/ml) por uma hora a 37° C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS-BSA e a leitura foram detectadas no filtro 530/30nm para Ca²⁺ intracelular. Os dados foram analisados com o software Cell Quest (BD Bioscience, USA). A liberação intracelular de Ca²⁺ foi expressa pela média geométrica (%) de intensidade de fluorescência de Fluo-3 (Honorio-França et al, 2013).

4.8. Análise Estatística

Para avaliar a concentração de citocinas IFN- γ , TGF- β IL-4 e IL-17, bem como os índices de liberação do ânion superóxido, fagocitose, atividade microbicida, apoptose e liberação de cálcio intracelular, foram realizados ensaios *in vitro* todos em duplicata e utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas 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 tabelas, apresentados na sequência abaixo:

- Concentração de citocinas em culturas de células e *G. lamblia*;
- Produção de ânion superóxido
- Atividade Microbicida
- Apoptose
- Liberação de cálcio intracelular

5.1. Concentrações de citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17) liberadas em culturas de fagócitos MN na presença de *G. lamblia*.

A concentração de citocinas liberadas em cultura de fagócitos MN e trofozoítos de *G. lamblia* estão apresentadas na tabela I. Observa-se que durante a interação de fagócitos MN e *G. lamblia* houve liberação de todas as citocinas avaliadas. O IFN- γ foi a citocina que se apresentou em maior concentração no sobrenadante de cultura de fagócitos MN e *G. lamblia*. As demais citocinas avaliadas apresentaram valores similares.

Tabela I. Concentração de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura pelos fagócitos MN na presença de trofozoítos de *G. lamblia*.

<i>Citocinas</i>	<i>Concetração (pg/ml)</i>
IL-4	5.43 \pm 0.36
IFN- γ	14.50 \pm 3.1
TGF- β	6.44 \pm 0.82
IL-17	6.30 \pm 0.44

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

5.2. Liberação de ânion superóxido por fagócitos MN na presença de citocinas.

A liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN estimulados por citocinas na presença de *G.Lamblia* estão apresentadas na tabela II. Observa-se que houve aumento da liberação de superóxido quando os fagócitos MN foram estimuladas pelas citocinas. As maiores concentrações de superóxido foram observadas quando os fagócitos MN foram previamente tratados pelo TGF- β (tabela 2).

Tabela II. Liberação de ânion superóxido na interação entre Fagócitos MN e *G. lamblia* na ausência e presença de citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).

Fagócitos MN incubados com	Ânion Superóxido (nmols)
PBS	1.8 \pm 0.8
<i>G. lamblia</i>	2.1 \pm 0.8
<i>G. lamblia</i> + IFN- γ	7.1 \pm 1.2* ⁺
<i>G. lamblia</i> + TGF- β	12.6 \pm 2.6* ⁺
<i>G. lamblia</i> + IL-4	5.4 \pm 1.4* ⁺
<i>G. lamblia</i> + IL-17	6.5 \pm 1.6* ⁺

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. P<0.05.

* diferenças entre os fagócitos não tratados (controle) e os tratados com citocinas.

⁺diferenças entre fagócitos MN incubados com *G. lamblia* não tratados (controle) por citocinas e os incubados com *G. lamblia* tratados pelas citocinas.

5.3. Atividade fagocítica de células MN para *G. lamblia*

Na figura 1 estão apresentados os índices de fagocitose de células MN tratados por IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17. Observa-se que os índices fagocíticos de células MN foram maiores quando estas células foram tratadas por citocinas. Os maiores índices de fagocitose de *G. lamblia* foram observados quando as células MN foram tratadas com TGF- β . As citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-4 mostraram índices fagocíticos similares e maiores quando comparados aos índices de células MN não tratadas pelas citocinas.

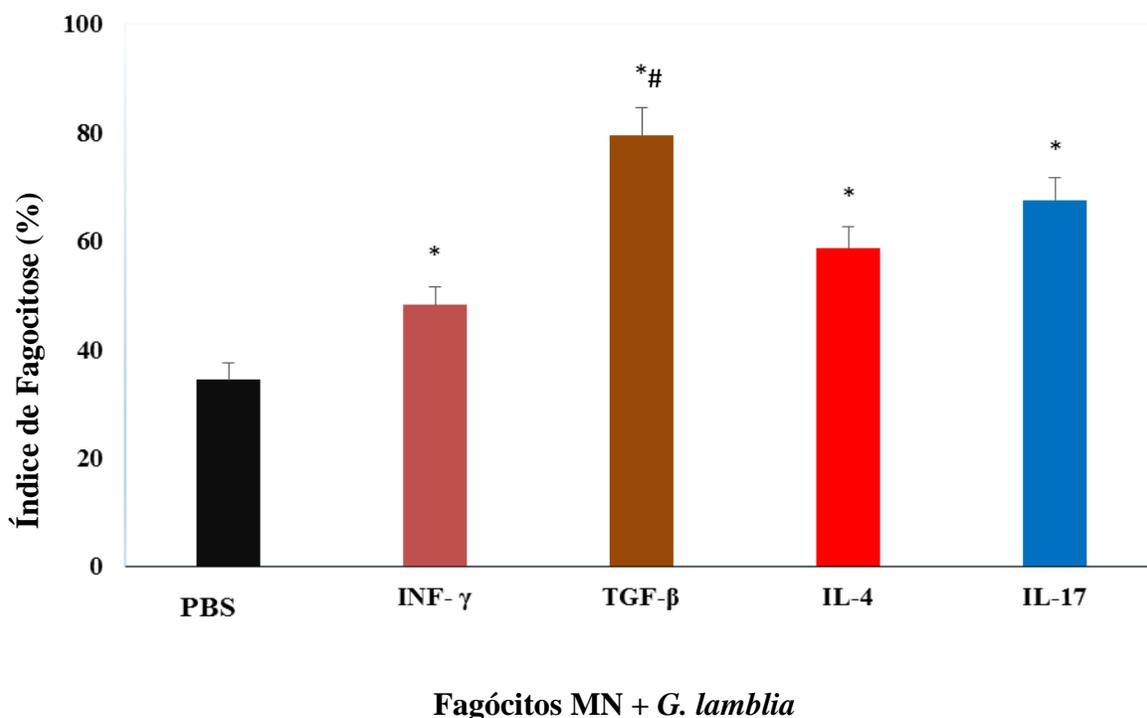


Figura 1. Índice de fagocitose na interação dos MN + *G. lamblia* na presença de citocinas.

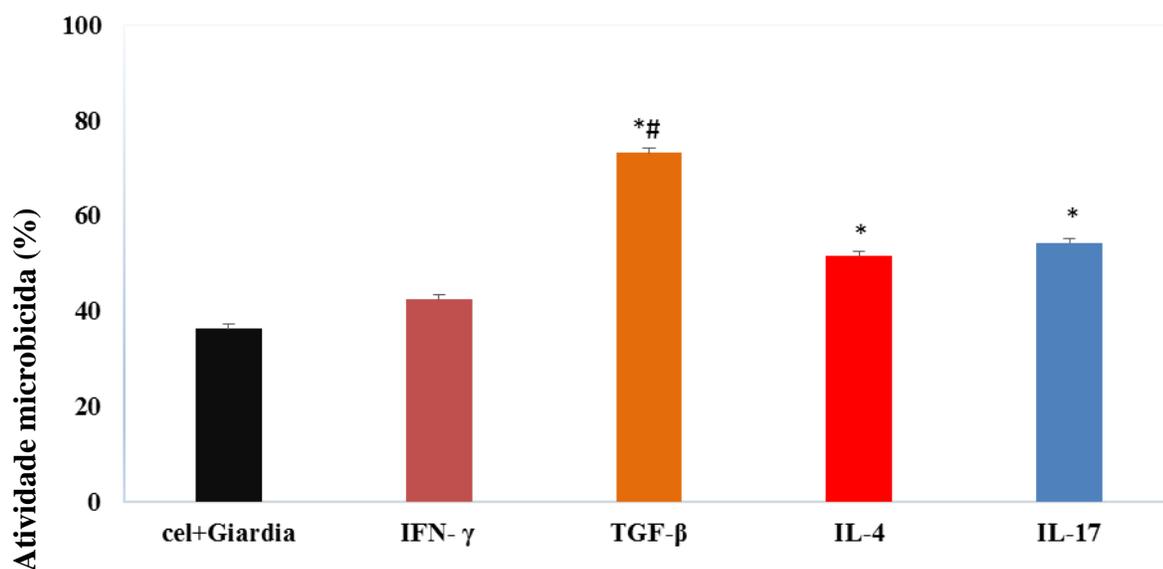
P < 0.05.

* indica diferenças em relação aos fagócitos MN não tratados (controle) e os tratados com citocinas.

diferenças entre os fagócitos MN do grupos tratados por citocinas.

5.4. Atividade microbicida dos fagócitos MN para *G. lamblia*

A atividade microbicida dos fagócitos MN tratados com IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 para *G. lamblia* são apresentados na figura 2. Observa-se que houve aumento dos índices microbicidas quando os fagócitos MN foram tratados por TGF- β , IL-4 e IL-17. Os maiores índices microbicidas foram observados quando os fagócitos MN foram tratados pelo TGF- β . O tratamento pelas citocinas IL-4 e IL-17 apresentaram índices microbicidas similares e superiores aos índices microbicidas observados pelos fagócitos MN tratados por IFN- γ e os fagócitos MN não tratadas pelas citocinas.



Fagócitos MN + *G. lamblia*

Figura 2. Atividade microbicida dos fagócitos MN tratados por citocinas (IFN- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) na presença de *G. lamblia*. P<0.05.

*indica diferença entre o grupo controle (sem citocinas) com os grupos tratados com citocinas.

indica diferenças entre os grupos tratados com citocinas.

5.5. Índice de apoptose de fagócitos MN em presença de *G. lamblia*, tratados, ou não, por citocinas.

Os índices de apoptose fagócitos MN em presença de *G. lamblia* estão apresentados na figura 3. Os fagócitos MN apresentaram baixos índices apoptóticos na ausência de *G. lamblia*. Quando estas células foram incubadas com *G. lamblia* houve aumento de morte por apoptose.

Houve aumento dos índices de apoptose quando os fagócitos MN foram tratados pelas citocinas e incubados com *G. lamblia*. Estes índices de apoptose foram maiores quando os fagócitos MN foram tratadas pelo TGF- β e menores quando os fagócitos MN foram tratadas pela IL-4. Os fagócitos MN tratados por IFN- γ e IL-17 apresentaram índices de apoptoses similares aos índices observados quando os fagócitos MN não foram tratados pelas citocinas, porém incubados com o parasito, e maiores aos índices observados pelo fagócito MN não tratados pelas citocinas e não incubada pelo parasito.

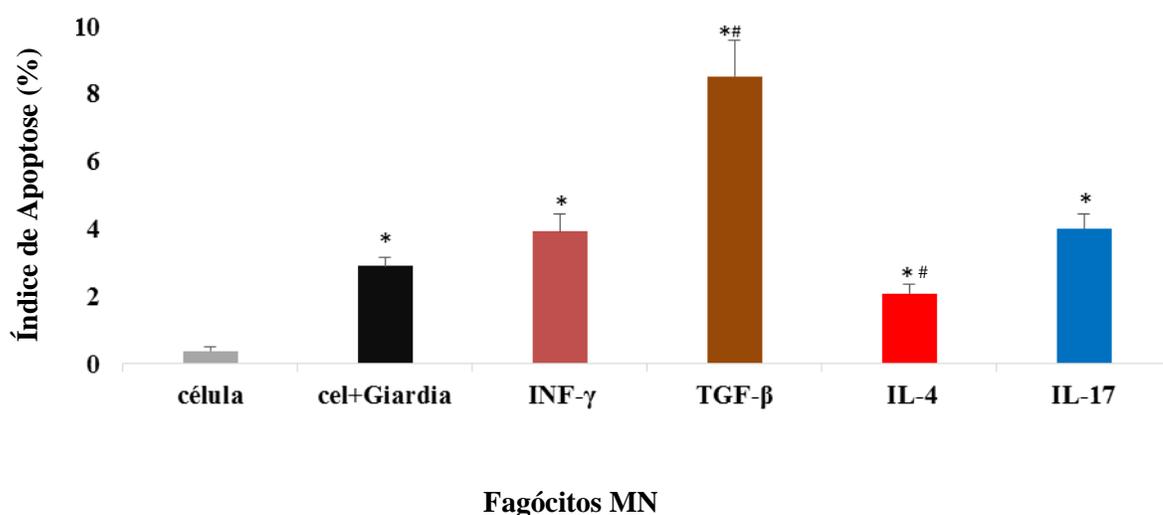


Figura 3. Índice de apoptose de fagócitos MN tratados por citocinas (IFN- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) durante interações com *G. lamblia*. $P < 0.05$.

*indica diferenças entre o grupo controle (sem citocinas) com os grupos tratados com citocinas.

indica diferenças entre os grupos tratados com citocinas.

5.6. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados, ou não, por citocinas.

A liberação de cálcio intracelular por fagócitos MN estimulados por citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 estão apresentadas nas figuras 4. Os fagócitos MN foram marcadas por Fluo-3 (Fluo-3 Acetoxymethyl) e a intensidade da fluorescência foi analisada por citometria de fluxo e expressa em média a intensidade de fluorescência. Observa-se que houve aumento da liberação de cálcio intracelular de fagócitos MN tratados com IFN- γ e IL-4. Quando os fagócitos MN foram tratados com TGF- β e IL-17 observa-se que a liberação de cálcio intracelular foi similar a liberação de fagócitos MN não tratadas pelas citocinas.

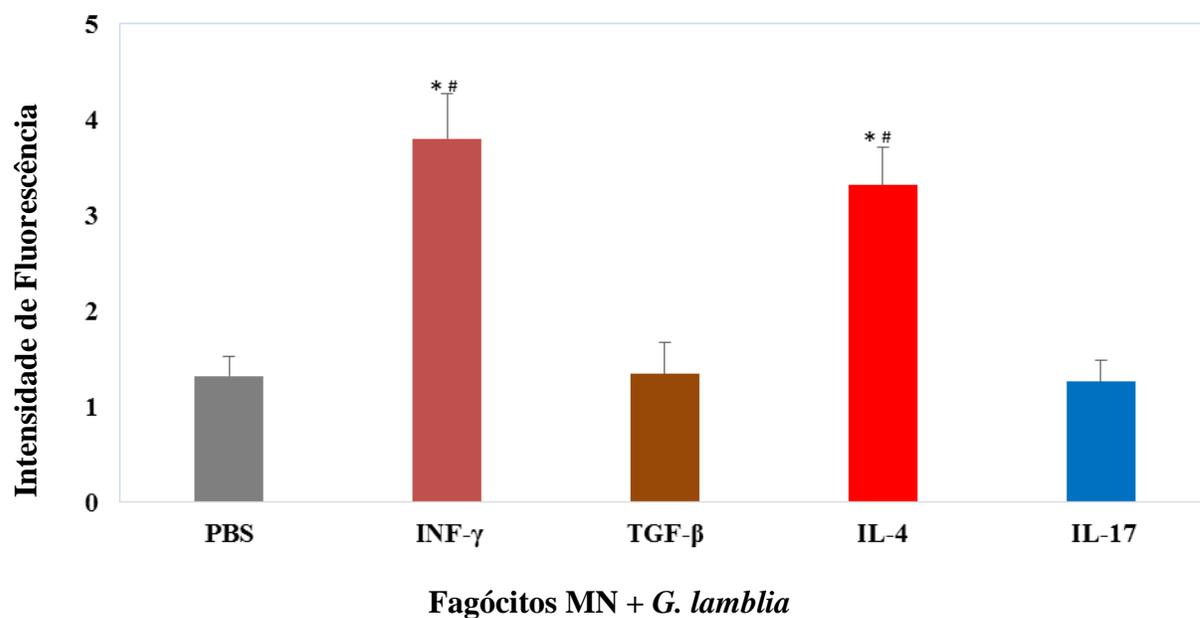


Figura 4. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados por IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17. P<0.05.

* indica diferenças entre o grupo controle (sem citocinas) com os grupos tratados com citocinas.

indica diferenças entre os grupos tratados com citocinas.

6. Discussão

A variação da resposta imunológica do hospedeiro é de fundamental importância para determinar o curso e a sintomatologia na IFNecção por *G. lamblia*. Fatores ligados ao parasito como virulência, patogenicidade, número de cistos ingeridos e presença de Infecções concomitantes, bem como ao hospedeiro, como condição imunológica, idade e estado nutricional determinam, em conjunto, o curso clínico da IFNecção (Boreham, 1991).

A giardíase é um grave problema de saúde em países em desenvolvimento, sendo considerada uma das principais Infecções por parasitos em humanos (Eckmann, 2003). Este trabalho descreve as concentrações das citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 em sobrenadante de culturas de fagócitos MN do sangue humano e *G. lamblia*, e como estas citocinas modulam a atividade funcional de fagócitos MN durante interações com o parasito.

A resposta imunológica para giardíase tem papel relevante para a proteção do hospedeiro. Sabe-se que o desenvolvimento desta doença depende de inúmeros fatores, dentre estes, as diferenças entre o parasito e a suscetibilidade do hospedeiro. Neste trabalho observou-se que em culturas de fagócitos e trofozoítos ocorre a liberação de IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17, sendo que maiores concentrações detectadas foram de IFN- γ .

O papel das células MN e os mecanismos efetores para *G. lamblia* tem sido relatado em vários estudos (Hill & Pearson, 1987), e estes sugerem que há correlação de citocinas com atividade citotóxica das células MN para *G. lamblia*, uma vez que células estimuladas por essas moléculas aumentam suas habilidades microbicidas.

O IFN- γ tem grande relevância, sobretudo na atividade de fagócitos (Fagundes et al. 2013). Por isso a participação da imunidade mediada por células MN tem papel fundamental nas Infecções por protozoários. Sabe-se que esta resposta imunológica induz uma cascata de eventos

como a secreção de citocinas pró-IFN λ amatórias, que permite o parasito evadir do sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo para patogênese (Baeza et al. 2010).

Neste trabalho também foi evidenciada a presença de TGF- β em culturas de células MN e *G. lamblia*. A importância desta citocina durante as interações fagócitos MN-parasito pode ser devido esta citocina ser ativa na imunidade de mucosa, atuando diretamente em fagócitos (Fagundes et al, 2013), bem como na produção de IgA (Corthésy, 2007). A IgA pode agir no lúmen intestinal impedindo a adesão da *Giardia spp.*, além de impossibilitar a permanência de antígenos excretados pelo parasito ao lúmen. Esta imunoglobulina pode neutralizar esses antígenos durante o transito pelo epitélio, inibindo diretamente a reprodução de *G. lamblia*.

Na literatura o papel imunomodulador do TGF- β é controverso. Alguns autores relatam que esta citocina apresenta efeitos inibitórios (Fank et al. 1992), enquanto outros efeitos estimulatórios (Fagundes et al. 2013). Acredita-se que a função do TGF- β depende de vários fatores como fenótipo da célula, estímulo e o local da resposta imunológica. Neste trabalho a produção do TGF- β durante as interações célulasMN/parasitos sugere que esta citocina além de determinar o recrutamento de células para o local da IFNecção (Celada & Maki, 1992), pode estimular estas células, o que corrobora com trabalhos anteriores (Fagundes et al. 2013). Estas células MN uma vez ativadas, provavelmente, aumentam a produção de IgA do tipo secretória na mucosa intestinal e atuam diretamente na eliminação do parasito.

As citocinas exercem efeitos na sinalização e regulação biológica em vários processos fisiológicos e estão relacionadas com a ativação dos fagócitos e produção de espécies reativas de oxigênio (Séguin et al. 1997). A eficiência da atividade microbicida dos fagócitos está relacionada ao estresse oxidativo e formação de espécies reativas do oxigênio (ROS), sendo este processo fundamental para eliminação de patógenos. A geração de radicais livres contribui para a

eficiência dos fagócitos, porém a persistência desses radicais e a produção de enzimas por alguns parasitos podem levar em morte da célula do hospedeiro (Ferrari & Junior, 2011).

Estudos relatam que, durante Infecções por protozoários ocorre participação ativa dos metabólitos de oxigênio (França et al. 2012; França et al. 2009; França et al. 2013). No presente estudo, as citocinas modularam a liberação do ânion superóxido. Houve aumento de liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN na presença de *G. lamblia*. Este aumento foi mais expressivo quando os fagócitos foram tratados pelas citocinas.

O reconhecimento de antígenos de *G. lamblia* é dependente de células T e tem importante papel para imunidade de mucosa. Alguns estudos relatam que em humanos a resposta imunológica celular para giardíase necessita da cooperação de fagócitos MN e IIFNócitos T circulantes (Crouch, 1991). Fagócitos MN sobre ação de citocinas podem levar a morte dos trofozoítos, sendo esta atividade atribuída ao estresse oxidativo. Esse mecanismo de ataque determina os mecanismos efetores como responsáveis pelo processo de eliminação do parasito (Faubert, 2000).

Neste trabalho a liberação do ânion superóxido, interferiu positivamente na capacidade microbicida das células. As citocinas foram capazes de modular a fagocitose de trofozoítos de *G. lamblia*. A fagocitose e a atividade microbicida de células, com produção de metabólitos ativos do oxigênio, são importantes mecanismos de defesa para várias Infecções bacterianas (Casares & Richie, 2009) fúngicas (Pacheco et al. 2014) e protozoários (França-Botelho et al. 2011). Citocinas como IFN- γ primeiramente atuam sobre monócitos e mácrofagos ativando seus mecanismos de fagocitose e microbicidas (Dickson-Gonzalez et al. 2009). Estudos *in vitro*, comprovam que células MN tem melhor atividade sob a ativação de citocinas como IFN- γ , uma vez que aumenta sua atividade microbicida (Chadee & Heerovitch, 1989).

No presente estudo a atividade de microbicida dos fagócitos foi IFNluenciada pelas citocinas, sendo o TGF- β mais eficaz neste processo, uma vez que potencializou o estresse oxidativo celular, com liberação de elevadas concentrações de ânion superóxido. O aumento de superóxido pode estar relacionado ao aumento de apoptose (Ferrari et al. 2009; Espino et al.2010; Espino et al., 2011)

A apoptose, ou morte celular programada (PCD), é uma resposta fisiológica que desempenha um papel importante no desenvolvimento normal no volume de células, mantendo um número de celular correto em organismos, equilibrando o crescimento celular e morte e está envolvida em vários processos patológicos (Earnshaw, 1995).

Este processo ocorre por uma família de proteases de cisteína intracelular presente como precursores latentes, que são ativados por meio de duas principais vias apoptóticas, isto é, uma extrínseca e um intrínseco. A via extrínseca é desencadeada por estimulação de receptores de morte, o que leva o recrutamento de pro-caspase-8 e a sua conseqüente clivagem na forma ativa caspase-8. A via intrínseca é ativada por vários estímulos que leva a danos e as mitocôndrias levam à ativação de pro-caspase-9. As duas vias convergem para ativar o efetor a jusante de caspase-3 (Thornberry E Lazebnik, 1998), que, também por de outras caspases efectoras, é responsável por alterações morfológicas de apoptose celular, encolhimento celular, condensação do cromossomo e fragmentação do DNA (Schwartzman & Cidlowski,1993; Hengartner, 2000).

A apoptose é um fator importante para a sobrevivência do parasito e patogenicidade (James & Green, 2004; Lisi et al. 2005; Picot, 2006). Em particular, nos casos de IFNecção por *G. lamblia*, indicam uma relação entre o enterócito, a apoptose e a perda da função de barreira epitelial duodenal, de humanos recém-IFNectados com trofozoítos de cepas de *G. lamblia* (Chin et al. 2002).

Neste trabalho houve aumento da atividade microbicida e do índice de apoptose durante interações de fagócitos MN-parasito. Estes índices foram maiores na presença do TGF- β . A literatura relata que a apoptose induzida por *G. lamblia* está relacionada com uma perda de células epiteliais em pequenas monocamadas intestinais, e aumento da permeabilidade num processo dependente de caspase-3 (Chin et al. 2002). Também parece que trofozoítos são capazes de induzir a apoptose, sugerindo um possível papel para moléculas liberadas pelo parasito, particularmente antígenos com uma atividade proteolítica (Jimenez et al. 2004).

Na literatura, alguns trabalhos mostram 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 IFN γ da *G. lamblia* em humanos é resultante de uma combinação de transporte epitelial e disfunção da barreira da mucosa intestinal (Troeger et al. 2007). Neste estudo, os altos índices de apoptose associados ao aumento da atividade microbicida e liberação de superóxido pelos fagócitos MN, observados na presença de TGF- β , provavelmente estão associados aos mecanismos efetivos da fagocitose que culminam com a morte do parasito.

Neste estudo também se observou comportamento similar de fagócitos MN na presença do parasito quando tratados por IL-17. Os índices microbicidas e de apoptose aumentaram na presença de IL-17.

Células Th17 e produtoras de IL-17 têm uma função pró-IFN γ amatória e podem induzir a produção de citocinas pró-IFN γ amatórias e quimiocinas, fazendo o recrutamento de células MN. A hipótese de que a IL-17 também desempenha um papel importante no desenvolvimento de

imunidade protetora é possível para *G. lamblia*, e tem sido mostrado em modelos experimentais (Müller & Von Allmen, 2005).

O papel da IL-17 na eliminação do parasito pode estar associado aos elevados níveis de TGF- β . Acredita-se que a população de células Th 17 induza uma regulação das células Treg e células TCD4 que pode aumentar a liberação de TGF- β . Assim, a cooperação das outras citocinas pode evidenciar a presença de ambos os perfis de imunidade quando na presença do trofozoito, sugerindo que a IL-17 possa ser uma citocina promissora para regulação da resposta imunológica e cooperação com outras células a fim de minimizar os danos causados pela *G. lamblia* (Scott et al. 2004).

A ação de citocinas também está associada com um número de processos tais como alterações no Ca^{2+} intracelular por fagócitos (Fagundes et al. 2013). Neste trabalho tanto TGF- β como a IL-17 apesar de aumentarem a liberação de superóxido e os índices de apoptose não alteraram a liberação de Ca^{2+} intracelular em fagócitos MN. Por outro lado foi observado que IFN- γ não alterou a atividade microbicida do fagócitos MN para *G. lamblia*, mas foi capaz de induzir aumento de liberação de superóxido, fagocitose, de apoptose e de calcio intracelular, sugerindo que estas citocinas determinam diferentes mecanismos microbicidas em fagócitos MN quando na presença do parasito.

Por outro lado, o aumento dos índices de apoptose pode estar relacionado ao aumento de cálcio intracelular (Espino et al. 2010; Espino et al. 2011). O aumento da liberação de superóxido modifica a resposta de Ca^{2+} intracelular e os eventos de fosforilação durante o metabolismo oxidativo (Carrichon et al. 2011), em resposta a hormônios (Morceli et al. 2013) e citocinas (Fagundes et al. 2013).

O aumento da liberação de superóxido pelos fagócitos MN na presença das diferentes citocinas e do parasito, e as diferentes respostas microbicidas encontradas sugerem efeitos imunomoduladores das citocinas diferenciados sobre a atividade microbicida destes fagócitos MN durante as Infecções por *G. lamblia*. Deve ser considerando que *G. lamblia* vive no intestino em contato constante com os fatores imunológicos da mucosa, e a interação destas citocinas e células MN pode ser um importante mecanismo de proteção conferido pela imunidade da mucosa.

Parece que a imunidade para protozoários é dependente de resposta do tipo Th1, e que a resposta do tipo Th2 com a produção de IL-4 pode causar processos IFNlmatórios e danos teciduais (Garcia-Zepeda, 2007). Por outro lado a resposta em relação a IL-4 se deve a mudança de resposta celular. Os resultados encontrados neste estudo para *G. lamblia* permitem concluir que a IL-4 foi capaz de ativar os mecanismos microbicidas dos fagócitos com produção ativa de metabólitos ativos do oxigênio, sem no entanto induzir os mecanismos de ativação de apoptose.

A evidência do papel modulador das citocinas sobre a atividade funcional de fagócitos sugere a importância de interações entre componentes solúveis, em especial as citocinas. Considerando que o habitat do parasito, os resultados do presente estudo reforçam a necessidade da integridade da imunidade do hospedeiro, tanto sistêmica como de mucosa, durante as Infecções por *G. lamblia*.

7. Conclusões

Conclusões

- ✓ As maiores concentrações de citocinas presentes em culturas de fagócitos MN- *G. lamblia* foram de IFN- γ e TGF- β ;
- ✓ O tratamento dos fagócitos MN pelas citocinas aumentou a liberação de superóxido quando estas células foram incubadas com *G. lamblia*;
- ✓ A fagocitose foi maior quando os fagócitos MN foram tratados pelas citocinas, sugerindo que a fagocitose é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro para *G. Lamblia*;
- ✓ A atividade microbicida dos fagócitos MN foi maior quando estas células foram tratadas pelas citocinas. Os maiores índices microbicidas foram observados quando os fagócitos foram tratados por TGF- β ;
- ✓ As citocinas IFN- γ , TGF- β e IL-4 induziu morte por apoptose em fagócitos MN-*G. lamblia*;
- ✓ Houve aumento de IFNluxo de cálcio intracelular pelos fagócitos MN estimulado por IFN- γ e IL-4;
- ✓ Estes dados sugerem que as citocinas, IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17, modulam a atividade funcional de fagócitos MN do sangue e esta atividade parece ser de fundamental importância para o controle da Giardíase.

Referências Bibliográficas

- Abdul-Wahid A, Faubert G 2008. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. *Int J Parasitol Oxford*, 38(6): 691-703.
- Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14(3):447-475.
- Ali AS, Hill DR 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin IFNect Dis* 16(5):453-60.
- Ament ME, Rubin CE 1972. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. *Gastroenterology*, New York, 62: 216-226.
- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol* 112 (4): 289-94.
- Appelbee AJ, Thompson RCA, Olson ME 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *Trends Parasitol* Calgary, 21(8): 371 – 376.
- Astiazaran GH, Quintero J, Veja R, Briceño P, Oviedo C, Rascon L, Garibay-Escobar A, Castillo-Yañez FJ, Robles-Zepeda R, Hernandez J, Velazquez C 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunol* 31:132–139.
- Aziz H, Beck CE, Lux MF, Hudson MJ 2001. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. *Clin Lab Sci* 14 (3): 150-154.
- Baeza IW, Alcantara-Hernandez M, Mancilla-Herrera, Ramirez-Saldivar I 2010. The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Biomed Biotechnol* 2010:1-12.
- Bansal D, Bhati HS, Sehgal R 2005. Role of cholesterol in parasitic IFNectations. *Lipids Health Dis* 4: 1-7.
- Bayraktar MR, Mehmet N, DURMAZ R 2005. Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in patients IFNected with *Giardia lamblia*. *Turkye Parazitol Derg* 29:160–162.
- Belosevic M, FAUBERT GM, DHARAMPAUL S 1994. Antimicrobial action of antibodies against *Giardia muris* trophozoites. *Clin Exp Immunol*, London, 95:485-489.
- Bernander R, Palm JED, Svärd SG 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol*, London, 3 (1): 55-62.
- Boreham PFL 1991. Giardiasis and its control. *Pharmaceutical Journal*, Washington, 234: 271-274.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KG 2002. *Giardia lamblia* disrupt tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*, London, 125:11-19.

- Byrd LG, Conrad JT, Nash TE 1994. *Giardia lamblia* IFNectin in adult mice. *IFNect Immun* 62: 3583–3585.
- Carlson JR, Heyworth MF, Owen RL 1987. T-lymphocytes subsets in nude mice with *Giardia muris* IFNectin. Thymus, *Dordrecht* 9: 189-196.
- Carrichon L, Picciocchi A, Debeurme F, Beaumel S 2011. Characterization of superoxide overproduction by the D-LoopNox4-Nox2 cytochrome b558 in phagocytes -Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim Biophys Acta* 1808: 78-90.
- Casares S, Richie TL 2009. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Curr Opin Immunol* 21(3): 321-330.
- Celada A, Maki RA 1992. Transforming growth factor- β 1 enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J Immunol* 148: 1102-1105.
- Chadee K, Heerovitch E 1989. *Entamoeba histolytica*: diffuse liver IFNlammation in gerbils (*Meriones unguiculatus*) with experimentally inducedamebic liver abscesso. *J Protozool* 36: 154-8.
- Chen Y, Thai P, Zhao YH, Ho YS, Desouza MM, Wu R 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 278: 17036–17043.
- Chin AC, Parkos CA 2007. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol* 2: 111–143.
- Chin AC, Teoh DA, Scott KGE, Meddings JB, Macnaughton WK, et al 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *IFNect Immun* 70: 3673–3680.
- Chin AC, Parkos CA 2007. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol* 2: 111–143.
- Cirak VY, Bauer, C 2004. Comparison of conventional coproscopical methods and comercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* IFNectins in dogs and cats. *Tierarztl Wochenschr* 117: 410-413.
- Corthésy B 2007. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol* 78: 27-32.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* IFNectins. *Int J Parasitol* 41: 925–933.
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M. & Thong, Y. H. 1991. Effect of human milk and IFNant milk formulae on adherence of *Giardia intestinalis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85:617-619.

- Daniels CW, Belosevic, M 1994. Serum antibody responses by male and female C57BL/6 mice IFNected with *Giardia muris*. *Clin Exp Immunol* 97: 424-429.
- Dickson-Gonzalez, S.M., M.L. De-Urbe and A.J. Rodriguez-Morales, 2009. Polymorphonuclear neutrophil IFNiltration intensity as consequence of *Entamoeba histolytica* density in amebic colitis. *Surgical IFNect* 2: 91-97.
- Djamiatun K, Faubert GM 1998. Exogenous cytokines released by spleen and Peyer's patch cells removed from mice IFNected with *Giardia muris*. *Parasite Immunol* 20: 27-36.
- Earnshaw WC. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* .7(3):337-43
- Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* 120: 2423–2431.
- Ebert EC 1999. *Giardia* induces proliferation and interferon g production by intestinal lymphocytes. *Gut* 44: 342–346.
- Eckmann L 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 25: 259–270.
- Erllich JH, Anders RF, Roberts-thomson LC, Schroder JW, Mitchell GF 1983. An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity reactions as contributing factors to chronic IFNfection with the intestinal protozoan parasite, *Giardia muris*, in mice. *Aust J Exp Biol Med Sci* 61: 599-615.
- Espino J, Bejarano I, Paredes SD, et al. 2011. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res* 51:195-206.
- Espino J, Bejarano I, Redondo PC, et al. 2010. Melatonin Reduces Apoptosis Induced by Calcium Signaling in Human Leukocytes: Evidence for the Involvement of Mitochondria and Bax Activation. *J Memb Biol* 233:105-18.
- Fagundes DLG, França EL, Morceli G, Honorio-França AC 2013. The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers. *Clin Develop Immunol* 2013:1-12.
- Fagundes DLG, Franca EL, Silva RT, HARA CCP, Morceli, G, HONORIO-FRANÇA ACC, Paranhos IM 2015. Changes in T cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. *J Mater Fetal Neonatal Med* 28 (in press).
- Fank RQ, Sensenbrenner L, Chen B 1992. Transforming growth factor- β 1 bifunctionally regulates murine macrophage proliferation. *Blood* 79: 1679-1685.
- Faubert G 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 13: 35–54.
- Ferrari CK & Junior A 2011. Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. *Rev Bras Geriatr Gerontol* 3:441-451.

- Ferrari CK, França EL, Honório-França AC. 2009. Nitric oxide, health and disease. *J Appl Biomed* 7: 163–173.
- França-Botelho AC, França JL, Oliveira FMS, Franca EL, Honório-França AC, Caliarri MV, Gomes MA 2011. Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. *Parasite Vectors* 62:1-6
- França-Botelho AC, Honório-França AC, França EL, Gomes MA 2006. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrual leukocytes. *Acta Paediatr* 4: 438-443.
- França EL, Bittencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honório-França AC 2011. Human colostrual phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. *J Microbiol Immunol IFNect* 44: 1-7.
- França EL, Feliciano ND, Silva KA, Ferrari CKB, Honório-França AC 2009. Modulatory Role of Melatonin on Superoxide Release by Spleen Macrophages Isolated from Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Bratisl Med J* 110: 517-522.
- França EL, França-Botelho AL, França JL, Ferrari CKB, Honorio-França AC. 2013. Repercussions of Breastfeeding by Diabetic Women for Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 14 (11): 6233-6239.
- Garcia-Zepeda EA, Rojas-Lopez A, Esquivel-Velazquez M & Ostoa-Saloma P 2007. Regulation of the IFNlammatory immune response by the cytokine / chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol* 29: 679-684.
- Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol* 124: 98–106.
- Goldin AJ, Werner APT, Aguilera X, Zulantay I, Warhurst DC, Milles MA 1990. Efficient diagnosis of giardiasis among nursery and primary school children in Santiago by capture ELISA for detection of fecal *Giardia* antigens. *Am J Trop Med Hyg* 42: 538-548.
- Gottstein B, Harriman GR, Conrad JT, Nash TE 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunol* 12: 659–673.
- Grit G, Van coppernolle S, Devriendt B, Geurden T, Dreesen L, Hope J, Vercruysse J, Cox E, Geldhof P, Claerebout E 2014. Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* IFNect in cattle. *Vet Parasitol* 202: 145–155.
- Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Mørch K, et al 2007. Persisting symptoms and duodenal IFNlammation related to *Giardia duodenalis* IFNect. *J IFNect* 55: 524–530.

- Hanson KL, Cartwright CP 2001. Use of an Enzyme Immunoassay Does Not Eliminate the Need To Analyze Multiple Stool Specimens for Sensitive Detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol* 39: 474-477.
- Hardin JA, Buret AG, Olson ME, Kimm MH, Gall DG 1997. Mast cell hyperplasia and increase macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *J Parasitol* 83: 908-912.
- Hautus MA, Abdillahi H, Laarman JJ 1987. Circulating IgG and IgA anti-*Giardia lamblia* antibodies in sera of symptomatic giardiasis patients. *Acta Leiden* 56: 47-55.
- Hawrelak J 2003. Giardiasis: pathophysiology and management. *Altern Med Rev.* 8: 129-142.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-6.
- Hermans PE, Diaz-buxo JA, Stobo JD 1976. Idiopathic late onset immunoglobulin deficiency. *Am J Med* 61: 221-237.
- Hewlett EL, Andrews JS Jr, Ruffier J, Schaefer III FW 1982. Experimental IFN γ infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. *J IFN γ Dis* 145: 89-93.
- Heyworth MF 1986. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. *IFN γ Immun* 52: 568-571.
- Heyworth MF 1992. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol* 78: 73-76.
- Heyworth MF, Carlson JR, Eral, TH 1987. Clearance of *Giardia muris* IFN γ infection requires helper/inducer T lymphocytes. *J Exp Med* 165: 1743-1748.
- Hill DR, Pearson RD 1987. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *IFN γ Immun.* 55 (12): 3155-61.
- Holland MJ, Marcus YM, Riches PL, Maizels RM 2000. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol.* 30: 1977-1987.
- Honorio-França AC, Carvalho MP, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM 1997. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol* 46: 59-66
- Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MSM, Monteiro RC 2001. Colostral neutrophils express Fc α receptors (CD89) lacking γ chain association and mediate nonIFN γ inflammatory of secretory IgA. *J Leuk Biol* 69: 289-296.
- Honorio-França AC, Lanes PKD, Ribeiro EB, Franca EL 2013. Chronopharmacology for Anthelmintic: Immune and Modified Release of Drugs Prospectus. *Sci Int* 1:22-28.

- Hoque ME, Hope VT, Kjellstrom T, Scragg R, Lay-Yee R 2002 Risk of giardiasis in Aucklanders: a case control study. *Int J IFNect Dis* 6: 191.
- Hughes WS, Cedra JJ, Holfezapple P, Brooks, FP 1971. Primary hypogammaglobulinemia and malabsorption. *Ann Intern Med* 74: 89-91.
- Hunter PR, Thompson RCA 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol* 35: 1181-1190.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal epithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30: 108–119.
- James ER & Green DR 2004 Manipulation of apoptosis in the host–parasite interaction. *Trends Parasitol* 20: 280–287.
- Jimenez JC, Morelle W, Michalsky JC, Dei-cas E 2007. Excreted/secreted glycoproteins of *G. intestinalis* play an essential role in the antibody response. *Parasitol Res* 100: 715–720.
- Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-cas E, Capron M 2004. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 152-160.
- Kolaczowska E, Kubes P 2013. Neutrophil recruitment and function in health and IFN λ inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159–175.
- Lalle M, Pozzio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò S 2005. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *G. duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35: 207-213.
- 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, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, Eckmann L 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia spp.* *IFNect Immun* 70: 11-18.
- Lee HY, Hyung S, Lee NY, Yong TS, Han SH, Park SJ 2012. Excretory–secretory products of *Giardia lamblia* induce interleukin-8 production in human colonic cells via activation of p38, ERK1/2, NF- κ B and AP-1. *Parasite Immunol* 34: 183–198.
- Li E, Zhou P, Petrin Z, Singer SM 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* IFN λ infections in mice. *IFNect Immun* 72: 6642-6649.
- Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, Brandonisio O & Panaro M 2005. IFN λ infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol* 52: 211–217.

- Lloyd D, Ralphs JR, Harris JC 2002. Hydrogen production in *Giardia intestinalis*, a eukaryote with no hydrogenosomes. *Trends Parasitol* 8: 155-156.
- Ludwing KM, Frei F, Alvares FF, et al. 1999 Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 547-555.
- Macglade TR, Robertson ID, Elliot AD, Thompson RCA 2003. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet Parasitol* 110: 197-205.
- Mei J, Liu Y, Dai N, Hoffmann C, Hudock KM, et al. 2012. Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest* 122: 974-986.
- Meyer E 1990. (ed), Giardiasis. Elsevier Publishing Co., New York, N.Y.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *IFNect Genet Evol* 3: 29-38.
- Monis PT, Thompson RCA 2003. Cryptosporidium and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *IFNect Genet Evol* 3: 233-244.
- 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: 1-8.
- Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW, Forbes DA, Rich G, Thompson RCA 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. *J Clin Microbiol* 36: 995-998.
- Müller N, Von Allmen N 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* IFNectons. *Int J Parasitol* 35: 1339-1347.
- Mundi H, Björkstén B, Svanborg C, Ohman L, Dahlgren C 1991. Extracellular release of reactive oxygen species from human neutrophils upon interaction with *Escherichia coli* strains causing renal scarring. *IFNect Immun* 59: 4168-72.
- Nash TE, Aggarwal A 1986. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *J Immunol* 136: 2628-2632.
- Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM 1987. Experimental human IFNectons with *Giardia lamblia*. *J IFNect Dis* 156: 974-984.
- Oberhuber G, Stolte M 1990. Giardiasis: analysis of histological changes in biopsy specimens of 80 patients. *J Clin Pathol* 43: 641-643.
- Olson BE, Olson ME, Wallis PM (Eds.) 2002. *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. *Cab Int* 217-238.

- Olszewer E 1995. *Radicais livres em medicina*. São Paulo: BYK, 204pp.
- Ortega YR, Adam RD 1997. *Giardia* overview and update. *Clin Infect Dis* 25: 545-550.
- Pacheco-Yepez J, Jarillo-Luna RA, Gutierrez-Meza M, Abarca-Rojano E 2014. Peroxynitrite and peroxiredoxin in the pathogenesis of experimental amebic liver abscess. *Biomed Res Int* 3: 24-30.
- Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V, Mitolo CI, Acquafredda A, et al 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *Fems Immunol Med Microbiol* 51: 302–309.
- Petri WA, Haque R, Mondal D, Karim A, Molla IH, et al 2009. Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clin Infect Dis* 48: 1191–1197.
- Picot S 2006. Apoptosis and programmed cell death. Host parasite relationship new paradigm. *Med Trop* 66: 111–117.
- Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RCA 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 32: 229–231.
- Rendtorff RC 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Epidemiol* 59: 209–222.
- Ridley MJ, Ridley DS 1976. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. *J Clin Pathol* 29: 30-34.
- Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, et al 2008. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol* 159: 85–91.
- Rivera M, Parte MA, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M 2002. Giardiasis intestinal. Mini-*Revisión*. *Invest Clin* 43: 19- 128.
- Rocha MO 2004. *Giardia duodenalis*: axenization and characterization of three isolates from Brazil, employing biological, biochemical, immunological and molecular parameters. *Rev Inst Med Trop* 46: 188.
- Roxstro LK, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Staffan GS 2006. *Giardia* immunity – an update. *Trends Parasitol* 22: 26-31.
- Roxstrom-lindquist K, Ringqvist E, Palm D, Svard S 2005. *Giardia lamblia* induced changes in gene expression in differentiated caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 73: 8204–8208.
- Savioli L, Smith H, Thompson A 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends Parasitol* 22: 203–208.

- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, et al. 2000. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* 164: 4783–4789.
- Scott KGE, Linda CH, Yu, Andre GB 2004. Role of CD8 and CD4 T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *IFNect Immun* 72: 3536–3542.
- Scott KGE, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG 2002. Intestinal IFN γ with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology*, New York, 123: 1179-1190.
- Sedinová J, Flegr J, Ey PL, Kulda J 2003. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis for the identification of *Giardia intestinalis* subtypes and phylogenetic tree construction. *J Euk Microbiol* 50: 198-203.
- Segal, AW; Soothill, JF.1983. Phagocytes. In.: Soothill, JF. *Pediatr Immunol* Local: Blackwell, p.37.
- Séguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K 1997. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *IFNect Immun* 7: 2522-2527.
- Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17: 413–423.
- Singer SM, Nash TE 2000. T-Cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* IFN γ responses in mice. *IFNect Immun* 8: 170-175.
- Skea DL, Underdown BJ 1991. Acquired resistance to *Giardia muris* in X-linked immunodeficient mice. *IFNect Immun* 59: 1733-1738.
- Smith PD, Keister DB, Elson CO 1983. Human host response to *Giardia lamblia*. II. Antibody-dependent killing in vitro. *Cell Immunol* 82: 308-315.
- Snider DP, Skea D, Underdown BJ 1988. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the xid gene. *IFNect Immun* 56: 2338-2342.
- Snider DP, Underdown BJ 1986. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to IFN γ with *Giardia muris*. *IFNect Immun* 52: 271-278.
- Stevens DP, Frank DM, Mahmoud AAF 1978. Thymus dependency of host resistance to *Giardia muris* IFN γ : studies in nude mice. *J Immunol* 120: 680-682.
- Sulaiman IM, Jiang J, Singh A, Xiao L 2004. Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 70: 3776-3380.

- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, et al. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318–324.
- Teoh DA, Kamieniecki D, Pang G, Buret AG 2000. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and a-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistanc. *J Parasitol* 86: 800–806.
- Thompson RCA 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35.
- Thompson RCA, Monis PT 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137.
- Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* 32: 71- 160.
- Thompson, R. C. A., Hopkins, R. A., and Homan, W. L., 2000, Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* IFNecting mammals, *Parasitology* 16: 210–218.
- Thornberry NA & Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 28; 281(5381):1312-6.
- Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, et al 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* IFNecton on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 56: 328–335.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, Di pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, et al 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 219: 118–142.
- Van Keulen H, Macichko PT, Wode S, Schaaf S, Walis PM, Erlandsen SL 2002. Presence of Human *Giardia* in domestic, farm and wild animal and environmental samples, suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol* 108: 97 – 107.
- Venkatesan P, Finch RG, Wakelin D 1996. Comparison of antibody and cytokine responses to primary *Giardia muris* IFNecton in H-2 congenic strains of mice. *IFNect Immun* 64: 4525-4533.
- Venkatesan P, Finch RG, Wakelin D 1997. A comparison of mucosal IFNlammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol* 19: 137-143.
- Ward HD 2009. Intestinal protozoal parasites and diarrheal disease in Bangladesh. *Clin IFNect Dis* 48: 198–1200.
- Weltman JK 2000. Cytokines: regulators of eosinophilic IFNlammation. *Allergy Asthma Proc.* 21: 203–207.

Referências Bibliográficas

Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM 2008. The coordinated action of G-CSF and ELR+CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute IFN γ inflammation. *Blood* 111: 42–49.

Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ 2006. Response to the newly proposed species *Cryptosporidium pestis*. *Trends Parasitol* 22: 469-474.

Zajac AM, Johnson J, King SE 2002. Evaluation of the importance of centrifugation as a component zinc sulfate fecal flotation examination. *J Am Anim Hosp Assoc* 38: 221-224.

Zhou P, Li E, Robertson J, Nash T, Singer SM 2003. Role of interleukin- 6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* IFN γ infections in mice. *IFNect Immun* 71: 1566–1568.

Zhou P, Li E, Shea-Donohue T, Singer SM 2007. Tumor necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* IFN γ infection in mice. *Parasite Immunol* 29: 367–374.

Anexo 1 – IFNormações do Projeto

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 1 – IFNormações do Projeto



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: IMUNOMODULAÇÃO DE FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO POR CITOCINAS NA PRESENÇA DE *Giardia lamblia*.

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF: 03255674689	Nome: Maximilian Wilhelm Brune
Telefone: (66) 3401-9572	E-mail: maxbrune@hotmail.com

Instituição Proponente

CNPJ:	Nome da Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
-------	--

E um estudo Internacional? Não

Equipe de Pesquisa

CPF	Nome
14125068836	Adenilda Cristina Honorio França
53631927649	Eduardo Luzia França
55049575672	Maria Aparecida Gomes

Área de Estudo

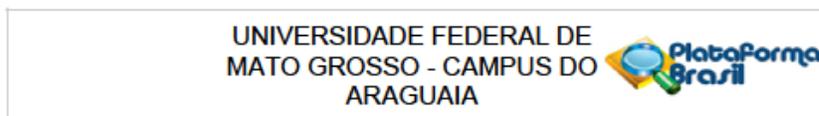
Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

Grande Área 2. Ciências Biológicas

Título Público da Pesquisa: IMUNOMODULAÇÃO DE FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO POR CITOCINAS NA PRESENÇA DE *Giardia lamblia*.

Contato Maximilian Wilhelm Brune

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNOMODULAÇÃO DE FAGÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO POR CITOCINAS NA PRESENÇA DE Giardia lamblia.

Pesquisador: Maximilian Wilhelm Brune

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 27280114.0.0000.5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 684.338

Data da Relatoria: 21/03/2014

Apresentação do Projeto:

: Giardia lamblia é um parasita intestinal encontrado principalmente em países em desenvolvimento, com elevada prevalência em crianças. A giardíase pode permanecer assintomática ou evoluir para sintomas severos, como diarreia, dor abdominal e cefaléia. A resposta imune da infecção por G. lamblia em humanos apresenta pouca ou nenhuma inflamação na mucosa. Na literatura estudos têm determinado que algumas citocinas estão envolvidas na imunidade para G. lamblia, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- γ (TNF- γ). O papel das células fagocíticas parece ser muito importante na giardíase, porém pouco se conhece sobre os efeitos imunomoduladores de citocinas. Assim o objetivo do presente trabalho será avaliar in vitro a imunomodulação de fagócitos do sangue humano por citocinas e os perfis de respostas Th1, Th2, Th3 e Th17 na presença de G. lamblia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar o perfil Th1, Th2, Th17 em culturas de células do sangue humano na presença de G. lamblia e analisar a atividade funcional de fagócitos do sangue humano tratados por citocinas na presença do parasito.

Objetivo Secundário:

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

Anexo 3– Termo de consentimento livre e esclarecido

<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - UFMT CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA – CUA</p> <p style="text-align: center;">TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</p> <p>Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, da pesquisa “IMUNOMODULAÇÃO POR CITOCINAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS NA PRESENÇA DE <i>G. lamblia</i>”. Após ser esclarecida 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 Campus Universitário do Araguaia - UFMT- pelo telefone (66) 34015317. O objetivo deste estudo é avaliar o comportamento do protozoário frente a ação dos fagócitos modulados por citocinas. 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.</p> <p>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. Maximilian Wilhelm Brune, odontólogo, nº cel. 66 81127743, e-mail: maxbrune@hotmail.com.</p> <p>Considerando os dados acima, CONFIRMO estar sendo informado por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa e em caso de divulgação por foto e/ou vídeo AUTORIZO a publicação.</p> <p>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.</p> <p>_____</p> <p style="text-align: center;">Assinatura do participante</p> <p>_____</p> <p style="text-align: center;">Assinatura do pesquisador principal</p> <p>Data (Cidade/dia mês e ano) _____ de _____ de 2014.</p>
