

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

Perfil Bioquímico, Hematológico e Imunológico  
de gerbils (*Meriones unguiculatus*)  
experimentalmente infectados por  
*Giardia lamblia*

Frederico Ferreira Gil

Belo Horizonte - MG

2016

Frederico Ferreira Gil

Perfil Bioquímico, Hematológico e Imunológico  
de gerbils (*Meriones unguiculatus*)  
experimentalmente infectados por  
*Giardia lamblia*

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

Área de concentração: Protozoologia

**Orientadora:** *Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes (Parasitologista)* – Laboratório de Amebíase e  
Protozoários Intestinais, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Belo Horizonte - MG

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2016

## PREÂMBULO

“Alice – Poderia me dizer,  
por favor, qual é o  
caminho para sair daqui?”

Gato – Isso depende  
muito do lugar para  
onde você quer ir.

Alice – Não me importa  
muito onde.

Gato – Nesse caso,  
não importa por qual  
caminho você vá”.

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

Ao meu pai, Jorge,  
minha mãe, Ana Lúcia,  
minha irmã, Fernanda,  
minha esposa, Fernanda,  
minha filhinha querida, Isabela,  
pelo carinho, companheirismo e amor.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

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

## AGRADECIMENTOS

Muito especialmente à minha querida Cidinha, pelo carinho, atenção, prestatividade e acima de tudo, por sempre depositar muita confiança no meu trabalho, mostrando-se, a todo o momento, dedicada e pronta a ajudar naquilo que fosse preciso, independente de serem assuntos de trabalho ou pessoais.

Ao Fabiano (Dr. Joseph Fabiano Guimarães Santos) que me orientou quanto as melhores metodologias para apresentar as análises estatísticas feitas a partir dos resultados da pesquisa.

À Edna (Edna Maria Pires) pelas inúmeras contribuições que nos momentos mais decisivos da pesquisa foram fundamentais para o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Joãozinho (João da Costa Viana) e Prof. Edward (Edward Felix Silva) pelo convívio enriquecedor, conselhos oportunos e suporte técnico.

Aos colegas Michelle, Dirce, Luciana, Thaísa, Mayana, Joice, Lina, Márcia, Fabrício e Evaldo do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais do ICB-UFMG, pelo companheirismo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Sumara e Sibebe, pelo apoio e atenção dada em todos os momentos.

Ao Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, na pessoa de seu chefe Professora Élide Mara Leite Rabelo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À minha esposa Fernanda pelo carinho, amor e amizade, sempre me apoiando e incentivando nos momentos difíceis e inundando de alegrias a minha vida.

À minha filhinha Isabela que me inspira e enche meus dias de alegria.

Ao meu pai Jorge, minha mãe Ana Lúcia, minha irmã Fernanda e a todos os meus familiares que sempre me apoiaram incondicionalmente.

A todos que passaram por mim durante meu doutorado, contribuindo, mesmo que de forma inconsciente, para meu engrandecimento pessoal e profissional.

E finalmente a Deus.

Muito obrigado!



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema Ilustrativo de Trofozoíto e Cisto de *Giardia* sp. ....Pág. 8
- Figura 2** - *Giardia lamblia* – Ciclo de Vida. ....Pág. 10
- Figura 3** - Mecanismos de defesa do hospedeiro contra a *G. lamblia*.....Pág. 17
- Figura 4** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média de peso antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). ....Pág. 48
- Figura 5** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da glicemia antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....Pág. 49
- Figura 6** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da insulina antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....Pág. 50
- Figura 7** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do colesterol antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....Pág. 51
- Figura 8** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do triglicérides antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....Pág. 53
- Figura 9** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da proteína total antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). ....Pág. 54

**Figura 10** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da albumina antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....**Pág. 54**

**Figura 11** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do cortisol antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....**Pág. 55**

**Figura 12** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do cálcio antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 56**

**Figura 13** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do TGO(AST) antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 57**

**Figura 14** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do TGP(ALT) antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 58**

**Figura 15** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da fosfatase alcalina antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 59**

**Figura 16** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média das hemácias antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....**Pág. 61**

**Figura 17** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da hemoglobina e hematócrito antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0) .....**Pág. 62**

**Figura 18** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do ferro sérico antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....**Pág. 63**

**Figura 19** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do RDW antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 64**

**Figura 20** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do infiltrado inflamatório antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias) em 125.000 $\mu\text{m}^2$  de lâmina própria. \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 68**

**Figura 21** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do tamanho dos neutrófilos bastonetes antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....**Pág. 69**

**Figura 22** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média das células calciformes antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....**Pág. 71**

**Figura 23** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da relação cripta/vilosidade antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).....**Pág. 72**

**Figura 24** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-4 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 75

**Figura 25** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-6 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 76

**Figura 26** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do TGF- $\beta$  antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 77

**Figura 27** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do Interferon- $\gamma$  antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 78

**Figura 28** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-11 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 80

**Figura 29** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-12 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 81

**Figura 30** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-17 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 82

**Figura 31** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IgA sérica anti-*Giardia* antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 83

**Figura 32** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IgA secretória anti-*Giardia* antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 84

**Figura 33** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IgG sérica anti-*Giardia* antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 85

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Caracterização molecular de diferentes linhagens e subtipos de *Giardia lamblia*, capazes de infectar algumas espécies de animais .....Pág. 7
- Tabela 2** - Citocinas e respectivos iniciadores utilizados para extração de RNA .....Pág. 43
- Tabela 3** - Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da proteína C reativa antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0). .....Pág. 60
- Tabela 4** - Valores hematológicos antes e depois da infecção de gerbils por *Giardia lamblia* .....Pág. 66

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	- Microgramas
$\mu\text{L}$	- Microlitros
$\mu\text{m}$	- Micrômetro
$\mu\text{M}$	- Micromolar
ALT	- Alanina aminotransferase
AMP	- Peptídeos Antimicrobianos
AST	- Aspartato aminotransferase
ATCC	- American Type Culture Collection
ATP	- Adenosina trifosfato
CD	- Células dendríticas
CDC	- Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	- Comissão de ética no uso de animais
CHCM	- Concentração da hemoglobina corpuscular média
cm	- Centímetros
CWP1	- Proteína de parede celular – 1 (cell wall protein)
CWP2	- Proteína de parede celular – 2 (cell wall protein)
CWP3	- Proteína de parede celular – 3 (cell wall protein)
dl	- Decilitros
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DO	- Densidade ótica
DP	- Desvio padrão
dpi	- Dias pós infecção
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	- Estados Unidos da América
g	- Gramas
G	- Força da gravidade
<i>G. agilis</i>	- <i>Giardia agilis</i>
<i>G. ardae</i>	- <i>Giardia ardae</i>

<i>G. intestinalis</i>	- <i>Giardia intestinalis</i>
<i>G. lamblia</i>	- <i>Giardia lamblia</i>
<i>G. microti</i>	- <i>Giardia microti</i>
<i>G. muris</i>	- <i>Giardia muris</i>
<i>G. psittaci</i>	- <i>Giardia psittaci</i>
HCM	- Hemoglobina corpuscular média
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
ID	- Intestino Delgado
IEL	- Linfócitos intraepiteliais
IFN- $\gamma$	- Interferon gama
IgA	- Imunoglobulina A
IgE	- Imunoglobulina E
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL-1	- Interleucina-1
IL-2	- Interleucina-2
IL-3	- Interleucina-3
IL-4	- Interleucina-4
IL-5	- Interleucina-5
IL-6	- Interleucina-6
IL-10	- Interleucina-10
IL-11	- Interleucina-11
IL-12	- Interleucina-12
IL-13	- Interleucina-13
IL-16	- Interleucina-16
IL-17	- Interleucina-17
IL-21	- Interleucina-21
IL-22	- Interleucina-22
IL-23	- Interleucina-23
kg	- Kilogramas



LAPI	- Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais
M	- Molar
mg	- Miligramas
mL	- Mililitros
mM	- Millimolar
MO	- Microrganismo
NAD	- Nicotidamina adenina dinucleotídeo
NK	- Natural Killer
nm	- Nanômetros
NO	- Óxido nítrico
°C	- Grau celsius
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPD	- O-fenilenodiamina
PBS	- Phosphate buffered saline
PCR	- Polymerase chain reaction
PCR	- Proteína C reativa
pH	- Potencial hidrogeniônico
PMN	- Polimorfonucleares
PMSF	- Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PP	- Placa de payer
RDW	- Red Cell Distribution Width
RPM	- Rotações por minuto
sIgA	- Imunoglobulina A secretória
SII	- Síndrome do Intestino Irritável
SLU	- Serviço de limpeza urbana
sp	- Espécie
TGF- $\beta$	- Fator de transformação do crescimento beta
TGO	- Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	- Transaminase glutâmico-pirúvica
Th1	- Células T <i>helper</i> tipo 1

Th2	- Células T <i>helper</i> tipo 2
TMB	- Tetrametilbenzidine
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
VCM	- Volume corpuscular médio
VSP	- Proteína variante de superfície
WHO	- World Health Organization

## RESUMO

*Giardia lamblia* é um parasito amplamente distribuído no globo, infectando humanos e animais. As manifestações clínicas e seu impacto são expressivos em crianças podendo culminar em déficits no desenvolvimento físico e cognitivos. Infecções assintomáticas são frequentes e geralmente auto-limitadas. Os mecanismos patogênicos são pouco conhecidos e os relatos disponíveis são muitas vezes controversos. Questões básicas, como alterações hematológicas e bioquímicas oriundas da giardíase, não são conhecidas. Neste contexto, procuramos conhecer a evolução do perfil bioquímico, hematológico e imunológico de gerbils experimentalmente infectados com *G. lamblia*, buscando alterações metabólicas relacionadas ao desenvolvimento da doença. O perfil bioquímico foi avaliado pela dosagem sérica de alguns analitos. No 21º dia pós infecção (dpi), a glicemia começou a aumentar, apresentando um pico no 28º dpi. A insulina acompanhou o perfil de comportamento da glicose, sugerindo que a giardíase determina um processo inflamatório significativo a partir da terceira semana de infecção, gerando aumento da resistência insulínica. Durante a infecção observou-se progressiva diminuição das proteínas totais, com o paradoxal aumento de albumina, sugerindo um aumento da ingestão alimentar na infecção, gerando um estado de anabolismo com elevação da albumina. Esta hipótese é corroborada pela manutenção do peso dos animais infectados em comparação com os não infectados. O cortisol teve um comportamento como esperado, ou seja, uma elevação significativa após o 7º dpi até o 14º dpi, quando provavelmente os animais encontravam-se inflamados ainda com a infecção ativa pela *Giardia*, voltando a cair, mas para valores ainda significativamente maiores que o controle. Os níveis séricos de cálcio se apresentaram significativamente mais elevados a partir do 14º dpi, perdurando desse modo até o 63º dpi. Os resultados da dosagem dos analitos fosfatase alcalina, AST e ALT, não se alteraram com significância patológica, sugerindo que as funções hepáticas não seriam alteradas pela infecção. Colesterol e triglicerídeos apresentaram comportamento similar, com elevação significativa a partir do 21º dpi. Estes resultados corroboram com o estado inflamatório gerado pela giardíase. Machos e fêmeas apresentaram diferenças em alguns parâmetros analisados, contudo o comportamento do grupo dos machos individualmente foi similar ao comportamento dos grupos juntos, machos e fêmeas. Em muitas das nossas variáveis bioquímicas observou-se alteração a partir do 21º dpi, sugerindo que a giardíase possa constituir o gatilho dessas mudanças. Todas as variáveis hematológicas foram avaliadas. Os leucócitos não apresentaram alterações significativas no curso da

infecção. Foi observada redução significativa no número de hemácias, na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito, a partir da segunda semana de infecção, confirmando uma anemia relacionada à giardíase. A redução do nível de ferro sérico a partir da 3ª semana de infecção, apesar de não significativa, sugere a participação do ferro na anemia. Contudo, o peso dos animais no curso da infecção se manteve sem alterações significativas e os parâmetros hematimétricos começaram a retornar aos valores basais após a cura parasitológica, sem haver reposição de ferro. Esses resultados sugerem que a anemia na giardíase relaciona-se mais a alterações inflamatórias e metabólicas induzidas pelo parasito que a deficiência de ferro gerada pela má absorção do mineral. Apesar da ativação inflamatória sistêmica ter sido bem estabelecida nesse modelo, com a elevação de citocinas pró-inflamatórias, que podem ter sido ativadas por macrófagos e linfócitos, esta não foi suficientemente intensa para levar à alterações significativas no valor do leucograma. Observou-se uma queda constante, mas não significativa, do número de células de infiltrado inflamatório na lâmina própria até o D21, voltando a se elevar no D28. Contrapondo com os resultados da contagem de leucócitos intraepiteliais, os resultados relacionados à produção de muco e à relação criptas/vilosidades ficaram dentro das expectativas de uma infecção, ou seja, células caliciformes e a relação criptas/vilosidades tiveram um aumento constante e significativo ao longo do período do estudo. Avaliamos a expressão das citocinas IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ . Apesar da IL-4 ter apresentado uma elevação significativa sinalizando uma resposta do tipo Th2, não detectamos alterações no padrão de IgE. A ativação do sistema imune, com ativação de linfócitos para a produção de imunoglobulinas, parece relevante com elevação significativa da IgA sérica a partir da 2ª semana (D14), mantendo-se elevada, mas sem significância estatística. IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  tiveram um comportamento similar, com pico no D21, indicando que uma ação anti-inflamatória estaria em curso. Houve alterações significativas dos valores da IL-6 a partir da 2ª semana de infecção, mantendo-se elevada durante todo o período de infecção documentada (D14 a D28), com queda para valores próximos ao do controle no D35, quando a cura foi estabelecida. A IL-11 e a IL-17 elevam-se significativamente na 1ª semana (D7), com pico na 2ª e 3ª semanas, respectivamente, retornando ambas a valores próximos aos controles na 5ª semana (D35). Não houve alterações significativas dos valores da IL-12 durante o experimento, embora tenha havido uma discreta elevação ao longo do tempo, com um pico no D28.

Palavras-chave: *Giardia*, perfil bioquímico, hematológico e imunológico; cinética.

## ***ABSTRACT***

*Giardia lamblia* is a enteric parasite that infect human and animals, these parasite is distributed globally. The impact of clinical manifestations is observed in children resulting in deficits physical and cognitive development. Asymptomatic infections are frequent and usually auto-limited. The pathogenic mechanisms are poorly understood and available reports are often controversial. Basic questions such as haematological and biochemical changes from giardiasis they are not known. In this context, we pretended to know the evolution of the biochemical, hematological and immunological profile of gerbils experimentally infected with *G. lamblia*, searching for metabolic changes related to the development of the disease. The biochemical profile was evaluated by the serum dosage of some analytes. On the 21<sup>th</sup> day after infection (dai) glycemia increased, showing a peak at 28<sup>th</sup> (dai). Insulin followed the glucose behavior profile, suggesting that giardiasis determines a significant inflammatory process from the 3<sup>rd</sup> week of infection, resulting an increase of the insulin resistance. During infection, there was a progressive decrease in total proteins with the increase of albumin suggesting an increase of the dietary intake in the infection generating a state of anabolism with albumin elevation. This hypothesis is confirmed by the maintenance of the weight of the infected animals compared to uninfected. Cortisol behaved as expected. That is a significant increase after the 7<sup>th</sup> (dai) to the 14<sup>th</sup> (dai), when the animals were probably still inflamed with active infection by *Giardia*, falling again, but for values still significantly higher than the control. Serum calcium levels were significantly higher from the 14<sup>th</sup> (dai), thus remaining at 63<sup>rd</sup> (dai). The results of the alkaline phosphatase, AST and ALT analysis did not change with pathological significance, suggesting that hepatic functions would not be altered by infection. Cholesterol and triglycerides showed similar behavior, with a significant increase from the 21<sup>st</sup> (dai). These results contribute to the inflammation produced by giardiasis. Males and females presented differences in some analyzed parameters. However, behavior of the individual males group was like the behavior of both groups. In several biochemical variables analyzed it was observed a change from the 21<sup>st</sup> (dai), suggesting that giardiasis may be the trigger for these changes. All hematological variables were evaluated. Leukocytes did not present significant changes during infection. From the second week of infection it was observed the significant reduction in the number of red blood cells, hemoglobin concentration and hematocrit value confirming an anemia related to giardiasis. The reduction of serum iron level from the 3<sup>rd</sup> week of infection, although not significant, suggests the participation of iron

in the anemia. However, the weight of the animals during the infection remained unchanged and the hematometric parameters began to return to baseline values after parasitological cure, without iron replacement. These results suggest that anemia in giardiasis relates more inflammatory and metabolic changes induced by the parasite than iron deficiency produced by mineral malabsorption. Although systemic inflammatory activation has been well established in this model, with the elevation of proinflammatory cytokines, which may have been activated macrophages and lymphocytes, it was not strong enough to lead to significant changes in the leukogram value. A constant but not significant decrease in the number of inflammatory infiltrate cells was observed in the lamina propria until D21 resurfaced in D28. Compared with the results of intraepithelial leukocyte counts, the results related to mucus production and crypt/villus ratio were within the expectation of an infection. Goblet cells and the relationship crypts / villi had a constant and significant increase during the study period. We evaluated the expression of cytokines IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$ . Although IL-4 showed a significant elevation signaling a Th2-type response, we did not detect changes in the IgE standard. Activation of the immune system with activation of lymphocytes to produce immunoglobulins seems relevant with the significant increase of serum IgA from the second week (D14), remaining high, but without statistical significance. IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  had a similar behavior, with a peak in D21, indicating that an anti-inflammatory action would be under way. There were significant alterations in IL-6 values from the second week of infection, remaining elevated throughout the documented infection period (D14 to D28), dropping to values close to that of the control at D35 when cure was established. IL-11 and IL-17 increased significantly in the 1<sup>st</sup> week (D7), with peak in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> weeks, respectively, returning to values close to the controls in the 5<sup>th</sup> week (D35). There were no significant changes in IL-12 values during the experiment, although there has been a slight increase over time, with a peak in D28.

Keywords: *Giardia*, Biochemical, hematologic and immunological profile; kinetic

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Giardia lamblia</i> .....	3
1.2 Importância .....	4
1.3 Histórico.....	6
1.4 Variação genética.....	6
1.5 Formas evolutivas .....	8
1.6 Infecção e ciclo biológico .....	10
1.7 Relação parasito-hospedeiro .....	13
1.8 Resposta imune nas infecções causadas por protozoários .....	14
1.9 Resposta imune na infecção por <i>Giardia</i> .....	15
1.9.1 Imunidade inata .....	16
1.9.2 Imunidade adaptativa.....	19
1.10 Patogenia.....	21
1.11 Sinais e Sintomas .....	25
1.12 Metabolismo da <i>Giardia lamblia</i> .....	26
1.13 Tratamento .....	27
1.14 Modelo Experimental .....	28
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>32</b>
3.1 Geral.....	33
3.2 Específico.....	33
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>34</b>
4.1 Tipo de Estudo .....	35
4.2 Considerações éticas .....	35

4.3 Cálculo do tamanho amostral .....	35
4.4 Biotério .....	36
4.5 Modelo .....	36
4.6 Cepa de <i>Giardia</i> , cultivo e inóculo .....	37
4.7 Coleta de dados .....	37
4.8 Delineamento experimental .....	38
4.9 Análise estatística .....	38
4.10 Necropsia dos animais .....	39
4.11 Coleta de fezes .....	39
4.12 Perfil bioquímico e de imunoglobulinas plasmáticas .....	39
4.13 Perfil hematológico .....	41
4.14 Perfil de citocinas .....	42
4.15 Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal .....	43
4.16 Reação imunohistoquímica e análise quantitativa para trofozoítos .....	44
4.17 Destinação das carcaças .....	45
<b>5. Resultados / Discussão .....</b>	<b>46</b>
5.1 Perfil da infecção .....	48
5.2 Perfil Bioquímico – 1ª fase .....	49
5.2.1 Avaliação global .....	49
5.2.2 Avaliação das variáveis conforme sexo .....	65
5.3 Perfil hematológico – 2ª fase .....	61
5.3.1 Avaliação global .....	61
5.4 Perfil de citocinas – 3ª fase .....	74
5.4.1 Avaliação global .....	75
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>86</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>88</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>115</b>



# **1. INTRODUÇÃO**

Parasitas intestinais são os agentes causadores de infecções comuns responsáveis por significativos problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento. Alguns, como *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia lamblia*, *Hymenolepis nana*, *Taenia solium*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Cryptosporidium parvum* e *Enterobius vermicularis*, são transmitidos pela água ou alimentos contaminados. Outros, como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*, são transmitidos por larvas presentes no solo (Neves *et al.*, 2011).

As enteroparasitoses estão fortemente associadas à falta de saneamento básico, higiene e condições de vida e moradia, comprometendo não apenas a saúde do indivíduo, mas também a força de trabalho e, conseqüentemente, a geração de riquezas dos países. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o mundo, milhares de indivíduos estão impedidos de alcançar todo o seu potencial produtivo por não gozarem das condições mínimas de saúde. Um dos fatores responsáveis por essas deficiências são as doenças parasitárias, sendo as de caráter intestinal as doenças infecciosas mais prevalentes em todo o mundo (WHO, 2005).

A doença parasitária decorre de outros fatores que não a simples presença do parasito. É necessário que haja a clássica tríade epidemiológica das doenças parasitárias para que ocorra a infecção, quais sejam: *as condições do hospedeiro, o parasito e o meio ambiente*. A interação entre parasitos e seu hospedeiro humano é complexa, como não poderia deixar de ser, e as manifestações clínicas podem mudar ao longo do tempo. Novas doenças podem surgir e outras desaparecerem (Gordis, 2000).

Não há dados conclusivos que apontem fatores como a pré-disposição racial, genética ou alguma suscetibilidade específica como relevantes na prevalência de parasitos intestinais, embora pesquisa recente na região Amazônica (Estado do Pará, Brasil), tenha demonstrado que a ancestralidade genética europeia proteja da infecção invasiva por *Entamoeba histolytica* (Leite, 2015). Por outro lado, as diferenças na educação, na cultura e nos hábitos alimentares podem aumentar a exposição à infecção e predispor à reinfecção em áreas endêmicas (De Carli e Candia, 1992; De Carli *et al.*, 2006). Além disso, quadros graves ocorrem em pacientes com maior carga parasitária e comprometimento imunológico (Melo *et al.*, 2004).

De acordo com Ferreira *et al.* (2006), infecção parasitária pode ser definida como a penetração e desenvolvimento, ou multiplicação de um agente infeccioso no homem ou animal. Estima-se que o ser humano seja infectado por mais de 100 tipos de parasitos, sendo

estas infecções parasitárias responsáveis por mais de cem mil mortes ao ano, com 15 milhões de DALYs (Torgerson *et al.*, 2015).

Segundo Menezes *et al.* (2008), aproximadamente um terço da população de países subdesenvolvidos vive em condições ambientais que facilitam a disseminação de infecções parasitárias.

Dos protozoários eucariotos presentes no reino protista, o gênero *Giardia* merece especial atenção, principalmente nas infecções em crianças, sendo observados importantes quadros diarreicos (Thompson, 2000; Kool *et al.*, 2009).

### **1.1 *Giardia lamblia***

A *Giardia lamblia* (sinônimos *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) é um protozoário flagelado anaeróbio, porém, tolerante a oxigênio. De acordo com a sistemática tradicional, com base apenas na morfologia, a *Giardia* pertence ao Filo Sarcomastigófora, subfilo Mastigofora, Classe Zoomastigofora, Ordem Diplomonadida, Família Hexamitidae (Morrison *et al.*, 2007). De acordo com nova sistemática baseada em genética, morfologia e bioquímica, a *Giardia* pertence ao Filo Metamonada, subfilo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (Cavalier-Smith, 2003).

Causadora da doença conhecida como giardíase, a *Giardia* completa seu ciclo biológico em apenas um hospedeiro (Monoxeno) e não tem fase larval. Com isso pode reinfectar o mesmo hospedeiro onde se iniciou o ciclo (Ciclo Biológico Direto). As infecções são transmitidas por cistos que são excretados nas fezes de humanos e de animais infectados. Infectam o intestino delgado (ID) (duodeno e nas primeiras porções do jejuno e, às vezes, encontrados nos ductos biliares e na vesícula biliar) de uma grande variedade de espécies incluindo os seres humanos (Adam, 2001; Luján e Svärd, 2011).

As manifestações clínicas da giardíase podem variar de nenhum sintoma à diarreia aguda ou crônica com cólicas abdominais, náusea, flatulência, perda de peso, lesões intestinais e síndrome de má absorção de nutrientes que pode durar vários meses (Luján e Svärd, 2011). Em crianças, tanto nos quadros clínicos quanto sub-clínicos, a giardíase está relacionada ao comprometimento do desenvolvimento físico e cognitivo, quando associado a quadros de desnutrição crônica e imunossupressão (Thompson *et al.*, 1993).

Para o diagnóstico da giardíase usam-se três técnicas: a) exames coproscópicos por microscopia ótica para identificação de trofozoítos (em fezes diarreicas) ou de cistos (em fezes formadas); b) imunoensaio enzimático (ELISA) para identificação de antígenos de *Giardia*; c) aspiração de líquido ou biópsia duodenal para identificação de trofozoítos (Mandell, 2010).

## 1.2 Importância e Epidemiologia

Durante muitos anos não se deu importância à presença do protozoário *G. lamblia* em seres humanos, pois sua patogenicidade era discutível. Somente nas últimas décadas a infecção por *Giardia* começou a despertar interesse pela frequência com que era relatada e pela importância no desencadeamento dos quadros de diarreia e má absorção (Busatti *et al.*, 2006).

A maior prevalência da giardíase ocorre em crianças de oito meses a dez anos de idade, e constitui, nessa população, sério problema de saúde pública, principalmente quando associado a quadros de desnutrição e imunodeficiência (Gendrel *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2005; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Mondal *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2011).

Com ampla distribuição mundial, a *Giardia* é encontrada em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Desde os anos 70, vários estudos em países desenvolvidos têm mostrado quadros de contaminação em que a *G. lamblia* era o parasito mais comumente identificado, com prevalências entre 0,4-7% (Acha e Szyfres, 1987; Thompson *et al.*, 1990; Schantz, 1991; Hörman *et al.*, 2004; Cacciò e Ryan, 2008; CDC, 2010; Feng e Xiao, 2011; Painter, *et al.*, 2015) e era também o responsável por surtos epidêmicos de diarreia nos Estados Unidos (Ungar *et al.*, 1984; Baldursson e Karansis, 2011). As epidemias em países desenvolvidos têm sido atribuídas ao tratamento inadequado da água e sua contaminação com fezes humanas ou de animais, especialmente em coleções de águas superficiais e lagos. Nos países em desenvolvimento, a giardíase sempre mostrou alta e variável prevalência, oscilando de 1-60% em algumas áreas (Ungar *et al.*, 1984; Farthing, 1989; Goldin *et al.*, 1990; Cedillo-Rivera *et al.*, 2009; Oliveira, 2015).

Na Ásia, África e América Latina, onde cerca de 200 milhões de pessoas apresentam a doença sintomática, com cerca de 500.000 novos casos relatados a cada ano, a giardíase deve ser observada com especial cuidado, principalmente nas crianças (WHO, 2005), pois contribui de forma substancial para a geração de adultos com déficit no desenvolvimento físico e cognitivo (Busatti *et al.*, 2009).

Outras pesquisas indicam que o desenvolvimento econômico-social de diferentes regiões do mundo parece estar relacionado à ocorrência ou não dos quadros sintomáticos. Por razões indeterminadas, os casos assintomáticos (ausência de diarreia) nas infecções por *Giardia* são mais frequentes nos países desenvolvidos (Mason e Patterson, 1987; Hollm-Delgado *et al.*, 2008; Siwila *et al.*, 2010).

Devido à associação com surtos de diarreia em creches, *G. lamblia* foi reconhecida como uma infecção reemergente (Thompson, 2000). Sua alta prevalência e repercussões clínicas, fez com que, em 2004, a doença fosse incluída na “Iniciativa de Doenças Negligenciadas” pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Savioli *et al.*, 2006). Apesar disso, poucos são os estudos que se referem à quimioterapia desse parasito que infecta cerca de um bilhão de pessoas por ano (Wright *et al.*, 2003), sendo 280 milhões sintomáticos (Lane e Lloyd, 2002).

No Brasil e no mundo, a prevalência varia conforme a localidade, as populações estudadas e a metodologia empregada no estudo. A faixa etária mais atingida é a de pós lactentes e pré-escolares, tendo em vista que os bebês alimentados ao seio materno podem adquirir proteção através de gliconjugados e anticorpos IgA secretória, fornecidos pelo leite materno (Pickering, 2005). Estudos avaliando a ocorrência de giardíase em crianças de várias regiões mostraram que nos últimos vinte e cinco anos, a prevalência desta parasitose diminuiu; porém, permanece elevada, variando de 13,8% a 63,3% (Costa *et al.*, 1988; Torres *et al.*, 1991; Cury *et al.*, 1994; Guimarães e Sogayar, 1995) para 9,3% a 32,0% (Menezes *et al.*, 2008; Korke *et al.*, 2009; Tashima *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012; Assis *et al.*, 2013; Neres-Norberg *et al.*, 2014).

Sendo a giardíase uma zoonose, animais infectados (p.ex. cães, gatos) podem contribuir, também, para a contaminação do ambiente. Recente pesquisa na Coreia encontrou 33,2 % dos cães recolhidos das ruas, tanto jovens (idade  $\leq 1$  ano) quanto adultos (idade  $\geq 1$  ano) parasitados por *Giardia*, embora a prevalência em cães mais jovens fosse maior (Shin *et al.*, 2015). Na Polônia, usando a técnica de PCR, encontrou-se 21% dos animais da fauna silvestre analisados (javalis, raposas, veados, lobos, alce) parasitados pela *Giardia*. Este estudo foi o primeiro a encontrar *G. lamblia* da linhagem B em javalis e veados (Stojceki *et al.*, 2015). Em estudo na região norte/nordeste da Tailândia, encontrou-se 6% do gado leiteiro parasitado (linhagens A e E), indicando que o gado leiteiro pode participar ativamente na transmissão de *Giardia* entre animais e seres humanos (Inpankaew *et al.*, 2015), especialmente nos casos em que a ordenha não obedeça às melhores práticas higiênicas. Além

disso, a infecção de bovinos e outros animais de fazenda pode ter um impacto econômico resultante da perda de produtividade (O'Handley *et al.*, 2001).

### 1.3 - Histórico

A *Giardia* foi inicialmente observada em 1681, por Antonie Van Leeuwenhoek, a partir de fezes humanas diarreicas e melhor descrita por Lambl, em 1859. Inicialmente, empregou-se a denominação *Cercomonas intestinalis*, em humanos, e *Dimorphus muris* em roedores. Em 1888, Blanchard sugeriu o nome *Lamblia intestinalis*, em homenagem a Lambl. Em 1902, Stiles modificou para *Giardia duodenalis*. Kofoid e Christiansen propuseram os nomes *Giardia lamblia*, em 1915, e *Giardia enterica* em 1920, respectivamente.

A controvérsia a respeito da nomenclatura das espécies de *Giardia* continuou por muitos anos, até que Simon usou critérios morfológicos para distinguir *G. lamblia* e *G. muris*, sendo a *G. lamblia* considerada a espécie que parasita o homem, e a *G. muris* a de roedores. O nome *G. intestinalis* foi posteriormente utilizado por outros pesquisadores, mas o uso de *G. lamblia* não foi abandonado. Em 1952, Felice publicou a descrição morfológica detalhada da *Giardia* e, finalmente, propôs três espécies com base na morfologia do corpo celular: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis* (Adam, 2001).

Durante a década de 90, alguns pesquisadores adotaram o nome *G. intestinalis* (Kulda e Nohýnková, 1996), mas, atualmente, a denominação *Giardia lamblia*, quando associada à infecção em humanos, continua bem aceita pela literatura científica (Adam, 2001).

Atualmente, o gênero *Giardia* é composto por seis espécies. Destas, apenas *G. lamblia* pode infectar os seres humanos. *G. muris* é encontrado em roedores, *G. agilis* em anfíbios, *G. psittaci* em periquitos, *G. ardae* em garças e *G. microti* em ratos-almiscarados (Adam, 2001).

### 1.4 Variação genética

Para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença, susceptibilidade do hospedeiro, virulência, crescimento e desenvolvimento do parasito “in vivo” e “in vitro”, sensibilidade a drogas e antigenicidade (Thompson *et al.*, 1993), alguns estudos foram feitos e constataram que havia considerável diversidade genética de diferentes isolados (Thompson *et al.*, 1990; Mayrhofer *et al.*, 1995; Hopkins *et al.*, 1997; Thompson, Hopkins, Homan, 2000, Minetti, 2015).

Até o momento, demonstrou-se que existe um complexo de espécies agrupadas em oito linhagens distintas (A, B, C, D, E, F, G e H) (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010; Feng e Xiao, 2011), que apresentam morfologia com poucas variações, e que no Gênero *Giardia* as alterações genéticas podem conferir os diferentes perfis antigênicos e a especificidade de hospedeiros, encontradas em cada uma delas (Monis *et al.*, 2003).

**Tabela 1** – Caracterização molecular de diferentes linhagens e subtipos de *Giardia lamblia*, capazes de infectar algumas espécies de animais.

Linhagens	Algumas espécies comumente infectadas
A-I	Humanos e animais (gato, cachorro, bovinos, cervos, ratos almiscarados, castores, ratazanas, cobaias, furões).
A-II	Humanos (mais comum que A-I)
A-III e A-IV	Exclusivamente animais
B	Humanos e animais (bovinos, chinchilas, castores, saguis, roedores).
C e D	Cachorros, coiotes
E	Alpacas, bovinos, caprinos, suínos, ovinos
F	Gatos
G	Roedores
H	Focas, gaivotas

Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention – CDC - Consulta em 19/03/2015.  
<<http://www.cdc.gov/parasites/Giardia/epi.html>>

As linhagens A e B estão associadas à infecção humana, embora também sejam encontradas em várias outras espécies de mamíferos. Na infecção em humanos, a linhagem B é a mais frequente (Cassiò e Ryan, 2008; Franzén *et al.*, 2009; Feng e Xiao, 2011).

Alguns estudos, embora controversos, apontam que a linhagem B possa apresentar sintomas mais graves que a A (Thompson e Monis, 2004; Cacciò *et al.*, 2005). Outros têm relacionado sintomas mais graves a infecções pela linhagem A (Robertson *et al.*, 2010). Além disso, ambas as infecções pelas linhagens A e B têm sido relacionadas a diferentes graus de infecção em indivíduos saudáveis (Hanevik *et al.*, 2007). Um recente estudo realizado na Inglaterra mostrou que a linhagem A está mais presente nas infecções antigas e que a linhagem B causa a maioria das infecções (64% dos casos), sendo essas mais duradouras e com frequentes quadros de náuseas e vômitos (Minetti, 2015). Com base nesses resultados e considerando apenas o genótipo do parasito, não se pode explicar as diferenças nos sintomas ou grau de infecção em indivíduos saudáveis (Hanevik *et al.*, 2007). Características relacionadas ao hospedeiro também estão envolvidas na patogenia da doença (Hanevik *et al.*, 2007; Cotton *et al.*, 2011).

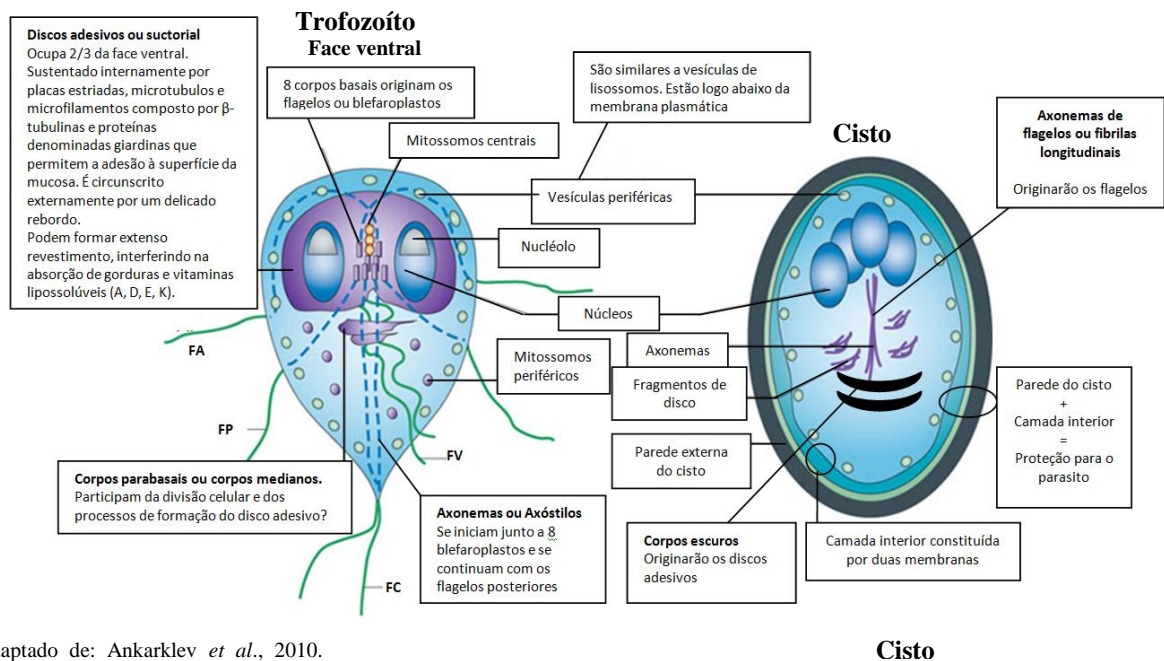
Os genótipos de *Giardia* que não infectam humanos incluem as linhagens C e D que são observadas em canídeos, E em gado (animais de produção), F em gatos, G em roedores, H em focas e uma amostra de gaivotas (Cacciò e Ryan, 2008; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010). Todavia, pelo menos alguns desses grupamentos genéticos podem ser transmitidos de animais para seres humanos e vice-versa (Cotton *et al.*, 2011).

Contudo, apenas os genótipos A, B e E podem ser cultivados satisfatoriamente *in vitro* (Luján e Svärd, 2011).

## 1.5 Formas evolutivas

A *Giardia* possui apenas duas formas evolutivas: cistos e trofozoítos (Figura 1).

**Figura 1** – Esquema ilustrativo de trofozoíto e cisto de *Giardia* sp.



Os trofozoítos são as formas não infectantes e responsáveis pelas manifestações clínicas da giardíase. Com o corpo em formato de pera (ou piriforme) e simetria bilateral (estruturas duplas e simétricas), apresenta achatamento dorso-ventral e são bastante deformáveis. Medem de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de largura, 12 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1 a 2  $\mu\text{m}$  de espessura (Neves *et al.*, 2011). Seu formato é sustentado por um complexo citoesqueleto que contém oito corpos basais, responsáveis por ancorar quatro pares de flagelos (anterior, posterior, ventral e caudal), que emergem do corpo celular e são responsáveis pela motilidade rápida e irregular do parasito (Rey, 2008). Encontram-se também os mitossomos centrais e



periféricos que são estruturas similares às mitocôndrias, bem como vesículas periféricas, similares aos vacúolos lisossômicos (Adam, 2001).

A nutrição do parasito ocorre por pinocitose através da membrana nas faces ventral e dorsal e o desenvolvimento é favorecido em pH 6,38 a 7,02. A reprodução é assexuada por divisão binária longitudinal (processo bastante complexo) e em laboratório são cultivados em meios HSP-1 e TPS-1 (Adam, 2001).

Os trofozoítos também apresentam um par de núcleos (com cariossoma central, mas sem cromatina periférica) rodeados por envelopes nucleares que permanecem praticamente intactos ao longo do ciclo celular (Solari *et al.*, 2003), dois axonemas de flagelos e dois corpos medianos formados por um conjunto irregular de microtúbulos em forma de vírgula. Embora já tenha sido proposto que os corpos medianos sejam importantes na nucleação do parasito como reserva de microtúbulos, e na biogênese do disco ventral (Piva e Benchimol, 2004), sua função ainda é incerta.

Uma estrutura característica do gênero - disco ventral, adesivo ou suctorial - ocupa dois terços da face ventral do trofozoíto e possibilita a adesão do parasito a diferentes estruturas, incluindo o epitélio intestinal do hospedeiro (Palm *et al.*, 2005; Carranza e Luján, 2010). Essa estrutura está ligada à membrana plasmática por microfibrilas compostas por  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, proteínas contráteis e proteínas do citoesqueleto denominadas giardinas (Elmendorf *et al.*, 2003; Palm *et al.*, 2005).

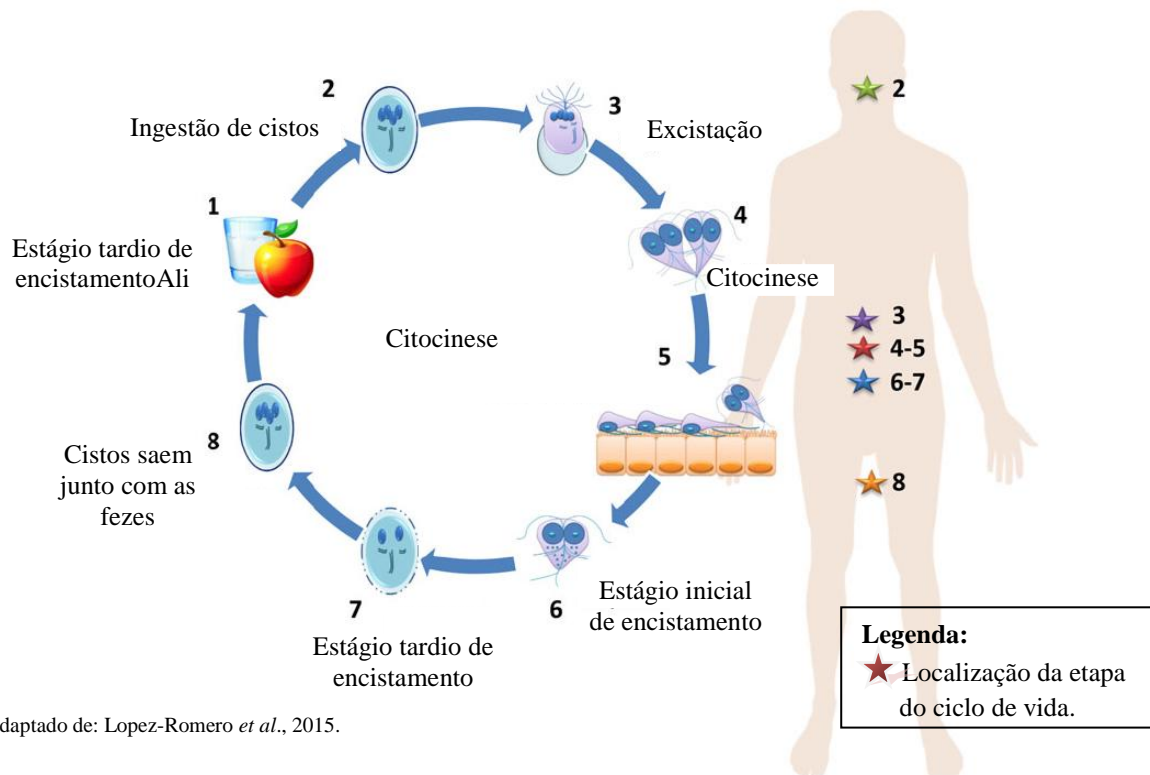
Os cistos apresentam o formato ovoide, contendo em seu interior dois ou quatro núcleos delimitados pela carioteca e ligados ao retículo endoplasmático, além de um número variável de fibrilas (ou axonemas de flagelos) que originarão os flagelos. Apresentam ainda fragmentos de disco e corpos escuros, em formato de vírgula, representando os primórdios do disco adesivo. Assim como nos trofozoítos, também estão presentes vesículas periféricas similares aos vacúolos lisossômicos. A parede cística é composta de uma camada exterior protofilamentosa e uma camada interna membranosa, formada, principalmente, por carboidratos (principalmente N-acetilgalactosamina) e três proteínas diferentes (CWP1, CWP2, CWP3), que lhe atribuem resistência e proteção às mais variadas alterações de temperatura, umidade e ação de produtos químicos (Aguilar-Diaz *et al.*, 2011).

Tanto nos cistos quanto nos trofozoítos, estão ausentes algumas organelas típicas dos eucariotos como mitocôndrias, peroxissomos e um complexo de golgi característico, além de alguns componentes necessários para a fosforilação oxidativa (Gillin *et al.*, 1996).

## 1.6 Infecção e ciclo biológico

A *Giardia* tem um ciclo de vida relativamente simples (Figura 2) que consiste em duas diferentes fases estruturais e bioquímicas de desenvolvimento. O trofozoíto (forma vegetativa), que coloniza o intestino do hospedeiro, e o cisto (forma infectante) que é resistente às variadas condições ambientais (Adam, 2001; Carranza e Luján, 2010; Ankarklev *et al.*, 2010).

**Figura 2** – *Giardia lamblia* – Ciclo de vida.



**Figura 2** – Ciclo de vida da *Giardia lamblia*. A rota de contaminação é fecal-oral. Infecção por *Giardia* começa com ingestão de alimentos e água contaminados com cistos (1 e 2). A exposição ao ambiente ácido do estômago induz o processo excistância da *Giardia* (3). Cada cisto produz quatro trofozoítos (4). Trofozoítos colonizam e se multiplicam no intestino delgado e podem se aderir ao epitélio intestinal (5). Com o deslocamento dos trofozoítos para as porções finais do intestino delgado, onde encontra um ambiente com baixos níveis de colesterol, rico em bile e ligeiramente alcalino, pode-se induzir o início do processo de encistamento; os trofozoítos sintetizam proteínas específicas para o encistamento que são transportados por vesículas à superfície da célula para formar a parede do cisto (6). O disco adesivo é desmontado e há uma replicação do DNA para se obter uma célula contendo dois núcleos ( $4n$  cada um). Durante a fase tardia do encistamento, o núcleo se divide novamente formando quatro núcleos ( $2n$  cada um), e o DNA é duplicado mais uma vez para formar um cisto maduro com quatro núcleos e uma ploidia total de  $16n$  (Ankarklev *et al.*, 2010) (7). Cistos são libertados nas fezes completando o ciclo de vida e tornando possível infectar novos hospedeiros (8).

Dois aspectos são importantes no contexto epidemiológico da doença: a resistência dos cistos no meio ambiente e a quantidade de cistos eliminados juntamente com as fezes pelos pacientes. Entre 10 e 100 cistos são suficientes para infectar o homem (Adam, 2001).


Os cistos já formados são irregularmente distribuídos tanto no bolo fecal quanto nas

diferentes evacuações, em quantidades que variam de centenas de milhares a milhões de exemplares diariamente (Goyal *et al.*, 2013), dependendo da carga parasitária que acomete o paciente. Os cistos, desde que em condições favoráveis de temperatura e umidade, podem permanecer viáveis no ambiente por até um ano, contaminando água e alimentos. A infecção se inicia com a ingestão destes alimentos ou água contaminados com cistos (Ekdahl e Andersson, 2005; Roxstrom-Lindquist *et al.*, 2006; Sprong *et al.*, 2009); é a chamada contaminação indireta.

A transmissão direta pessoa-pessoa (mãos contaminadas e fômites) constitui outro mecanismo de infecção que tem ganhado espaço particularmente em instituições coletivas como creches e orfanatos, entre membros da mesma família e entre homossexuais masculinos, através do contato oral-anal (Ungar *et al.*, 1984), podendo ser entendida, nesse contexto, como uma doença sexualmente transmissível. Esse tipo de transmissão está intimamente ligada às condições sanitárias e de higiene pessoal inadequadas (Abe e Teramoto, 2012).

A infecção acontece com a ingestão de cistos viáveis, por um hospedeiro susceptível, iniciando o ciclo da doença.

No estômago, os cistos tornam-se metabolicamente ativos, iniciando a excitação (Adam, 2001), ou seja, saem do estado de dormência para iniciar a formação dos trofozoítos. O meio ácido estomacal funciona como sinalizador dessa mudança (Lauwaet *et al.*, 2007), embora sejam pouco conhecidos os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. No duodeno, primeira porção do intestino delgado, as proteases pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, entre outras) funcionam como estímulo final do rompimento cístico (Aguilar-Diaz *et al.*, 2011), surgindo assim uma forma transitória entre o cisto e o trofozoíto chamada excizoíto. Sua principal característica é a ausência do disco adesivo e seus quatro núcleos tetraploides (Ankarklev *et al.*, 2010). Sem que ocorra a replicação do material genético, o excizoíto se divide duas vezes, originando quatro trofozoítos contendo cada um dois núcleos diploides (Bernander *et al.*, 2001). Essa amplificação celular explica, em parte, a baixa dose infectante de *Giardia* (dez a 100 cistos (Farthing, 1997)) necessária para o estabelecimento da infecção.

1 cisto  4 trofozoítos

Através de um processo bastante complexo, os trofozoítos se reproduzem assexuadamente por divisão binária longitudinal, colonizando rapidamente o intestino delgado.

A glicose é sua fonte primária de energia e, em menor quantidade, aminoácidos e colesterol do hospedeiro (Adam, 2001).

Limitando sua presença à luz intestinal, principalmente o duodeno e jejuno, uma vez que os protozoários do gênero *Giardia* não invadem os tecidos do hospedeiro<sup>1</sup>, nem tão pouco a corrente sanguínea, lá encontram um ambiente hostil devido à elevada concentração de enzimas digestivas e biliares. O estabelecimento da doença depende, em grande parte, da capacidade do trofozoíto em aderir ao epitélio intestinal. Por isso, o disco adesivo é uma organela crucial nesse processo (Carranza e Luján, 2010).

Aderidos aos enterócitos, colonizando o duodeno e o jejuno, os trofozoítos estão em um microambiente com pH próximo a neutro, devido à cobertura dos enterócitos pelo muco intestinal. Além de ser um mecanismo inato do sistema de defesa no controle da infecção (o muco intestinal contém proteínas com atividade bactericida, como a lisozima e anticorpos IgA), dificultando a adesão dos trofozoítos à mucosa, o muco protege o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas (Clayburgh *et al.*, 2004; Turner, 2006), bem como minimiza a degradação mecânica. Quando os trofozoítos estão aderidos à mucosa, os movimentos peristálticos são insuficientes para removê-los (Adam, 2001; Ankarklev *et al.*, 2010).

Durante o processo infeccioso, devido a condições desfavoráveis do microambiente intestinal para o crescimento do parasito pelo processo natural de renovação do epitélio intestinal que acontece a cada 3-5 dias, ou ainda para que evitem o aprisionamento pelo muco, os trofozoítos se soltam da parede intestinal e buscam se aderir novamente em outro local, mesmo que “lutando” contra os movimentos peristálticos. Quando não aderem novamente aos enterócitos, os trofozoítos estarão sujeitos a um ambiente ligeiramente alcalino, com baixos níveis de colesterol e rico em bile, o que acaba por desencadear o processo de encistamento (Luján *et al.*, 1998; Lauwaet *et al.*, 2007). Nesse momento, há a expressão de polipeptídeos e síntese de polissacarídeos que originarão a parede cística (Aguilar-Diaz *et al.*, 2011). Ao encistar, o trofozoíto torna-se globoso, cada núcleo se divide, formando quatro núcleos filhos com cariossoma central. O disco adesivo e os flagelos são desmontados, tornam-se intracitoplasmáticos, sendo armazenados dentro do parasito. Embora os trofozoítos também sejam encontrados nos ductos biliares, não se tem muita certeza sobre o papel da bile<sup>2</sup> no processo de encistamento (Adam, 2001; Lauwaet *et al.*, 2007, Carranza e Luján, 2010). Não se sabe se os estímulos de encistamento ocorrem dentro ou fora do cisto, mas se inicia no baixo íleo, sendo o ceco o principal local de encistamento. Embora alterações do pH sejam de

---

<sup>1</sup> Embora o recente trabalho de Reynoso-Robles *et al.* (2015) tenha identificado trofozoítos de *Giardia* dentro do epitélio do intestino delgado de um paciente intolerante à lactose e de os mesmos autores terem demonstrado a invasão de trofozoítos na mucosa e sub-mucosa de Gerbils infectados, até que novos estudos comprovem os achados, consideraremos o parasito como não invasivo.

<sup>2</sup> A **bile** é constituída por ácidos e sais biliares, colesterol, fosfolipídeos, etc.

extrema relevância nesse processo (Adam, 2001), alguns estudos usam da privação de colesterol como suficientemente necessário para iniciar a diferenciação de trofozoítos em cistos (Luján *et al.*, 1996).

Os cistos já formados são eliminados pelo organismo juntamente com as fezes e sob condições ideais de temperatura e umidade, permanecem viáveis no solo por cerca de até um ano, contaminando água e alimentos. Se ingeridos, podem reiniciar o processo infeccioso (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

## **1.7 Relação parasito-hospedeiro**

Diferentes formas de associação entre as espécies se estabeleceram durante o processo evolutivo. Nessas inter-relações pode haver benefício para as duas partes ou pode haver casos em que uma colhe os benefícios desta associação, enquanto para a outra pode ou não haver algum tipo de prejuízo. No primeiro caso enquadra-se a convivência “pacífica” e até necessária, com a microbiota intestinal humana, em que é mantido um equilíbrio dinâmico entre o metabolismo do hospedeiro e os microrganismos ali presentes. Para esse equilíbrio dinâmico é fundamental a ação do sistema imune do hospedeiro sobre os microrganismos (MO), modulando sua população a níveis não prejudiciais, bem como sistemas de escape sofisticados que os MO utilizam para manterem a infecção e também as adaptações fisiológicas que o hospedeiro naturalmente possui. No segundo caso estão as contaminações parasitárias em que o hospedeiro sofre diferentes graus de prejuízos fisiológicos enquanto o parasito desenvolve seu ciclo de vida.

Os vertebrados mantêm relações dos três tipos acima. No entanto, o último tipo, ou seja, aquela em que o hospedeiro sofre algum prejuízo fisiológico é a que leva ao desenvolvimento de doenças. A compreensão dessa complexidade de mecanismos é essencial para que se estabeleça uma ação eficiente e eficaz para a eliminação dessas infecções.

Embora a resposta imune desenvolvida para controle das diferentes infecções apresente certas particularidades, quer seja no sistema inato quer seja no sistema adaptativo, em geral, também apresentam mecanismos comuns. O avanço na pesquisa com diferentes patógenos tem contribuído para uma melhor compreensão da resposta imune decorrente da interação parasito-hospedeiro (Coelho-Castelo *et al.*, 2009). Mas a complexidade dos ciclos biológicos de alguns parasitos, e até mesmo o desconhecimento dos detalhes de algumas de suas etapas metabólicas e mecanismos de evasão do sistema imune, dificultam o

desenvolvimento de novas drogas e vacinas efetivas como também condutas terapêuticas que levem à eliminação do parasito ou, eventualmente, à retomada da convivência harmoniosa entre as duas espécies.

### **1.8 – Resposta imune nas infecções causadas por protozoários**

Para quase todas as infecções em geral, o número de indivíduos que apresentam as doenças é bem inferior ao número de indivíduos expostos à infecção. Isso indica que, na maioria dos casos, os hospedeiros conseguem impedir o progresso da infecção (Janeway, 2001).

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, há evidências de que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados a uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal, com conseqüente dano tecidual (Cooke *et al.*, 2004).

Soma-se a isso o fato de que deficiências na imunidade inata ou adaptativa estão associadas ao aumento de susceptibilidade a infecções (Janeway, 2001), ainda que, após a contaminação, a resposta imune seja fundamental no combate aos microrganismos, de modo a impedir a ocorrência de infecções.

O parasito pode ser eliminado de duas formas: 1- tão logo entre em contato com o sistema inato (Zambrano-Villa *et al.*, 2002) ou 2- sendo impedido de progredir ou se desenvolver devido à ação da resposta adaptativa.

Nem todos os parasitos que sobrevivem à ação do sistema imune levam a quadros sintomáticos no hospedeiro. Ou seja, na quase totalidade das doenças causadas por protozoários é muito comum que apenas uma parcela dos indivíduos infectados desenvolva a doença (Machado *et al.*, 2004).

Os protozoários possuem mecanismos de escape contra as agressões mediadas pelo sistema imune, podendo permanecer no hospedeiro por toda a vida, causando infecções assintomáticas que perduram por longo tempo, sem causar doença. Há um equilíbrio dinâmico nessa relação que pode ser quebrado por uma depressão do sistema imune ou por uma resposta exagerada contra o agente invasor, com inflamação tecidual. Deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas e deficiência do sistema de complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de anticorpos

ou deficiência da função de células T), associam-se ao aumento de susceptibilidade a infecções e o estabelecimento de quadros sintomáticos agudos ou crônicos (Janeway, 2001).

Esses fatos indicam que uma atuação equilibrada do sistema imunológico é muito importante para a contenção das infecções sem destruição tecidual, fazendo com que, embora presente, o agente infectante não cause doença (Machado *et al.*, 2004).

Colecionam-se evidências de que em muitas doenças infecciosas os quadros clínicos estão mais relacionados com uma resposta imune anormal, sendo frequente uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada que causa dano tecidual e que a ação direta do agente agressor possui capacidade limitada de agredir o hospedeiro (Machado *et al.*, 2004). Em outros casos, agentes infecciosos, seja por mimetizar antígenos próprios, por induzir proliferação de células auto-reativas ou por aumentar nas células infectadas a expressão de moléculas de MHC e moléculas coestimulatórias, podem desencadear doenças autoimunes (Cooke *et al.*, 2004).

### **1.9 – Resposta imune na infecção por *Giardia***

A infecção pela *Giardia* é autolimitada em mais de 85% dos casos, indicando a existência de eficiente mecanismo de defesa do hospedeiro contra o parasito (Faubert, 2000).

O desenvolvimento de imunidade protetora na giardiase é sugerido a partir de evidências, como: (1) natureza autolimitante da infecção; (2) menor suscetibilidade dos indivíduos de áreas endêmicas à infecção quando comparados aos visitantes; (3) detecção de anticorpos específicos anti-*Giardia* nos soros de indivíduos infectados; a produção inadequada de anticorpos parece ser a principal razão dos quadros clínicos mais graves a que são submetidos os imunodeprimidos (Eckmann, 2003); (4) participação de linfócitos na modulação da resposta imune; (5) maior suscetibilidade de indivíduos imunocomprometidos, o que aumenta a intensidade e duração da infecção (Heyworth *et al.*, 1987; Langford *et al.*, 2002; Olmez *et al.*, 2014).

O interessante é que casos de giardiase crônica foram documentados mesmo em indivíduos imunocompetentes (Eckmann, 2003), mostrando que a tríade epidemiológica das infecções parasitárias, é fundamental também na infecção pela *Giardia*. As relações entre características do parasito, do hospedeiro e do meio ambiente (incluindo o intestinal) são determinantes no estabelecimento, duração e repercussões clínicas da infecção.

O sistema imune da mucosa intestinal é extremamente complexo. Ele pode reconhecer e discriminar entre diferentes antígenos (alimentos, bactérias comensais e patogênicas) e ainda, responder adequadamente à presença de patógenos, via resposta imune inata ou adaptativa. Devido à característica do parasito de não invadir o endotélio, pouca ou nenhuma resposta inflamatória sistêmica ou local é observada<sup>3</sup>. De todo modo, importantes avanços para o entendimento da resposta imune inata ou adaptativa contra a *G. lamblia* vêm sendo alcançados (Figura 3) (Eckmann, 2003; Muller e von Allmen, 2005; Roxstrom-Lindquist *et al.*, 2006; Solaymani-Mohammadi e Singer, 2010).

A imunidade em *Giardia* ocorre em dois principais momentos: uma fase inicial (duas primeiras semanas após infecção), independente de células B, seguida de uma fase dependente de anticorpos (Eckmann, 2003; Li *et al.*, 2004).

### 1.9.1 - Imunidade inata

A imunidade inata, embora inespecífica, é uma rápida primeira linha de defesa contra a colonização de patógenos. Primariamente, a *Giardia* coloniza o duodeno e jejuno, ambos com elevada concentração de enzimas digestivas e bile, tornando o ambiente hostil para o desenvolvimento de microrganismos. Além disso, a descamação e renovação do endotélio, bem como a constante e necessária adesão e “desadesão” dos trofozoítos no endotélio para evitar que sejam aprisionados pelo muco<sup>4</sup> ou eliminados pelos movimentos peristálticos<sup>5</sup>, faz com que a taxa de infecção seja minimizada (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

A microbiota do intestino é um eficiente mecanismo de defesa do sistema inato, pois interfere na patofisiologia da infecção e, também, no crescimento e colonização da *Giardia*. Bactérias comensais<sup>6</sup> possuem um efeito anti-*Giardia* por competição, toxicidade direta ou modulação da resposta imune (Berrilli *et al.*, 2012; Goyal e Shukla, 2013). Por consequência, esses mecanismos reduzem a gravidade e duração da infecção, além de preservar a integridade do epitélio intestinal (Shukla *et al.*, 2012; Goyal *et al.*, 2013). Assim, diferenças na composição da microbiota dos hospedeiros e das linhagens dos parasitos poderiam explicar a variabilidade na susceptibilidade à infecção (Solaymani-Mohammadi e Singer, 2010).

---

<sup>3</sup> A interleucina IL-8 não foi induzida (Jung *et al.*, 1995), em contraste com o que é tipicamente observado em infecções intestinais que causam inflamação. IL-8 é a citocina chave que induz inflamação durante infecções intestinais bacterianas (Maaser e Kagnoff, 2002), e seu baixo nível durante a infecção por *Giardia* explica, em parte, os baixos níveis de inflamação.

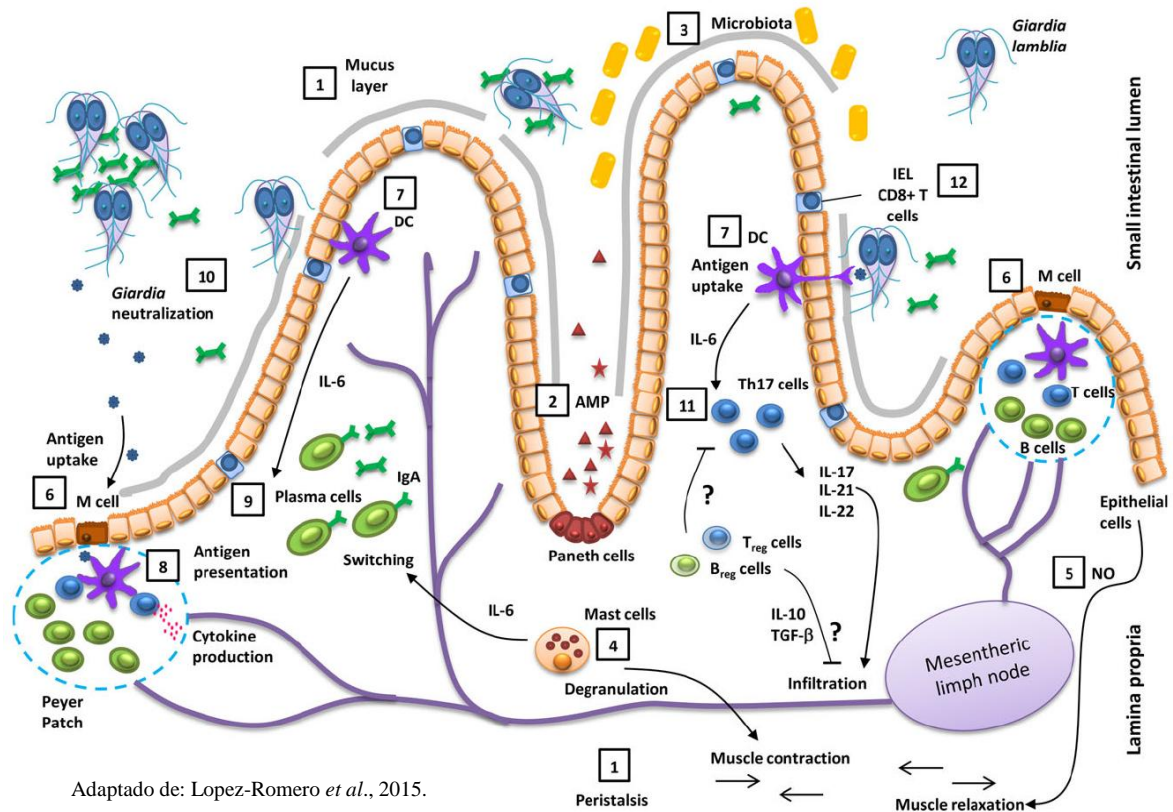
<sup>4</sup> O **muco**, secretado por células caliciformes do intestino, protege as células epiteliais contra a ação de enzimas digestivas, além de impedir o acesso de agentes patogênicos ao endotélio, incluindo a *Giardia* (Solaymani-Mohammadi e Singer 2010).

<sup>5</sup> Promovem o peristaltismo: Ação do NO; degranulação dos mastócitos, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6.

<sup>6</sup> Estimam-se concentrações de  $1 \times 10^4$  bactérias por ml do conteúdo do intestino delgado (McFarland, 2000).



**Figura 3** – Mecanismos de defesa do hospedeiro contra a *G. lamblia*.



Adaptado de: Lopez-Romero *et al.*, 2015.

**Figura 3** - Mecanismos de defesa do hospedeiro contra a *G. lamblia*. Sistema imune inato e adaptativo agem em sincronia para controlar a infecção pela *Giardia*. Mecanismos da imunidade inata são a primeira linha de defesa contra a colonização pela *Giardia*. A camada de muco na superfície intestinal e os movimentos peristálticos constituem barreiras mecânicas para a fixação dos trofozoítos de *Giardia* (1). Peptídeos antimicrobianos (AMP), sintetizados pelas células de paneth<sup>7</sup> e outras células, podem matar os trofozoítos (2). A microbiota do intestino possui um efeito anti *Giardia* por competição, toxicidade direta ou modulando a resposta do sistema imune. Além disso, a microbiota contribui para preservar a integridade do epitélio intestinal (3). Os mastócitos liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6; a degranulação dos mastócitos promove o peristaltismo (4). Enterócitos e células do sistema imune (macrófagos) produzem óxido nítrico (NO), que tem um efeito citostático<sup>8</sup> em trofozoítos, inibem os processos de excitação e encistamento e contribui para o peristaltismo (5). As células M<sup>9</sup> capturam por endocitose os antígenos do lúmen do intestino e os levam por transporte transepitelial para as placas de Peyer (PP) para induzir a resposta imune (6). As células dendríticas (DC) desempenham o papel de "conector" entre a imunidade inata e adaptativa. As células dendríticas estão localizadas na lâmina própria e nas PPs onde podem reconhecer antígenos. As células dendríticas também podem expandir seus dendritos para o lúmen intestinal para capturar os antígenos (7). As células dendríticas interiorizam e processam os antígenos de *Giardia* para posteriormente apresentá-los, através de moléculas MHC de classe II (MHC-II), às células T naive (Linfócitos. T naive). As células T ativadas liberam uma gama de citocinas que modulam a resposta anti *Giardia* (8). IL-6 libertada por mastócitos, células dendríticas ou células T são um importante modulador da maturação das células B que induzem a diferenciação de anticorpo para produzirem IgA (9). As células plasmáticas (ou plasmócitos) migram para lâmina própria para liberarem IgA, o que pode inibir a *Giardia* de aderir nas células epiteliais do intestino (10). Células Th17 e células T CD4<sup>+</sup> são ativadas durante a imunidade adaptativa precoce contra *Giardia* e liberam citocinas, tais como IL-17, IL-21, IL-22, as quais desempenham um papel pró-inflamatório (11). Linfócitos intraepiteliais (IEL) são principalmente células T CD8<sup>+</sup> e desempenham um papel no dano patológico do intestino durante a giardíase (12). Lacunas importantes no conhecimento sobre a relação hospedeiro-*Giardia*: Qual o papel das células Treg e Breg na regulação do processo inflamatório durante a infecção pela *Giardia*? Como trofozoítos de *Giardia* não invadem a mucosa, como podem os antígenos parasitários induzirem, de forma eficiente, resposta imune sistêmica e local (mucosa)? Como a infecção por *Giardia* rompe a barreira epitelial? Quais antígenos de *Giardia* podem induzir uma resposta imune protetora? Pode a *Giardia* modular os antígenos que serão apresentados às DC e macrófagos?

<sup>7</sup> **Células de paneth** são células do intestino delgado com função antibacteriana, anti fúngica e anti viral. Possuem grânulos que contêm hidratos de carbono, proteínas e zinco radioativos. Vivem de 18 a 23 dias, enquanto as outras células do intestino vivem de 3 a 5 dias.

<sup>8</sup> **Efeito citostático**: que evita a multiplicação e crescimento de células.

<sup>9</sup> **Células M**, ou micropregas, carregam partículas estranhas (antígenos) até os macrófagos adjacentes. Estão localizadas nas placas de Peyer no final do intestino delgado (íleo).

Há evidências de que o óxido nítrico (NO), produzido pelas células do epitélio intestinal e por células do sistema imune (macrófagos), contribua para eliminar os trofozoítos de *G. lamblia* (Eckmann *et al.*, 2000). Ele possui atividade citotóxica e imunomoduladora (Eckmann, 2003; Müller e von Allmen, 2005). O interessante é que, sendo a arginina o substrato precursor do NO, e o trofozoíto ser capaz de absorver e metabolizar a arginina como fonte de energia (Schofield *et al.*, 1992) era de se esperar que houvesse uma competição entre o trofozoíto e o hospedeiro pela arginina (Eckmann *et al.*, 2000). Esta competição poderia interferir na nutrição do hospedeiro, diminuindo a disponibilidade desse nutriente para ser absorvido, o que acabaria por afetar a produção do NO (Stadelmann *et al.*, 2012; Stadelmann *et al.*, 2013). Todavia, o que se observa é que pacientes adultos infectados com *Giardia* apresentam um aumento nos níveis de NO (Matowicka-Karna *et al.*, 2011), enquanto pacientes pediátricos infectados com *Giardia* apresentam uma redução dos níveis de NO (Mokrzycka *et al.*, 2010). Devido ao efeito citostático, o NO inibe os processos de excitação e encistamento. Trofozoítos do genótipo B e E são mais susceptíveis a ação do NO que o genótipo A (Benere *et al.*, 2012), sugerindo que o NO é genótipo dependente. Por fim, o incremento da oxido nítrico sintase neuronal aumenta o trânsito e motilidade intestinal que juntos formam uma importante barreira contra a colonização pela *Giardia* (Andersen *et al.*, 2006).

Células do sistema inato agem diretamente ou indiretamente contra a *G. lamblia*.

Apesar de não haver evidências de que a infiltração de PMN esteja associada com giardíase, já foi observado em ratos uma infiltração de neutrófilos na mucosa, como consequência indireta da presença do trofozoíto (Chen *et al.*, 2013).

Meeusen e Balic (2000) (in Jacobsen *et al.* (2012) associaram um quadro de eosinofilia<sup>10</sup> à exposição ao parasito.

Mastócitos liberam IL-6 que induzem a ativação e maturação das células B que induzem a diferenciação de anticorpos para a produção de IgA anti-*Giardia* (Li *et al.*, 2004). Além disso, agem juntamente com o NO induzindo o peristaltismo.

Células M, presentes no intestino, capturam por endocitose os antígenos do lúmen intestinal e os levam, por transporte transepitelial (Blumberg *et al.*, 1999), para as placas de Peyer (folículos linfoides formados fundamentalmente por células B) onde os apresentam

---

<sup>10</sup> **Eosinofilia** é uma quantidade anormalmente alta de eosinófilos no sangue. Não é uma doença, mas pode ser uma resposta a uma doença. Uma quantidade elevada de eosinófilos no sangue habitualmente indica uma resposta apropriada perante a presença de células anormais, parasitos ou substâncias que causam uma reação alérgica (alergenos). IL-5 desempenha um papel central no desenvolvimento, ativação e sobrevivência dos eosinófilos (Rosenberg *et al.*, 2013).

para os macrófagos para induzir a resposta imune.

As células dendríticas (CD) estão localizadas na lâmina própria e nas Placas de Peyer. Aderidas ao endotélio, expandem seus dendritos para o lúmen intestinal para reconhecer e capturar os antígenos específicos de *Giardia*. Uma vez ativadas, as CD interiorizam e processam os antígenos de *Giardia*, desfazem a conexão com o endotélio e migram para os órgãos do sistema imune local e sistêmico para, então, apresentá-los, através de moléculas MHC de classe II (MHC-II) e correceptores, às células T naïve com sua consequente ativação. As células T ativadas liberam uma gama de citocinas que modulam a resposta anti-*Giardia*. As CD desempenham o papel de "conector" entre a imunidade inata e adaptativa (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Várias citocinas<sup>11</sup> têm seus níveis aumentados, dentre elas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-5, IL-4, IL-2, IL-3, IL17, IL-22 e IL-23 (Lopez-Romero *et al.*, 2015), sendo a IL-6<sup>12</sup> a que apresenta as maiores taxas (Scheller *et al.*, 2011). Animais deficientes em IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$  tiveram diminuída sua capacidade de interromper a infecção por *G. lamblia* (Bienz *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007; Kamda *et al.*, 2012). Kamda *et al.* (2012) identificaram células dendríticas (originadas na medula óssea) como fonte de IL-6 que promove a eliminação da infecção por *G. lamblia* em ratos.

Em trabalho experimental com ratos, Singer e Nash (2000a) sugerem que os linfócitos T podem contribuir diretamente (ou seja, mesmo na ausência de anticorpos) para a eliminação da infecção causada pela cepa GS/M Clone H7 (ATCC 50581).

IFN- $\gamma$  e IL-4 são as principais citocinas produzidas durante as respostas Th1 e Th2, respectivamente. No entanto, animais de experimentação deficientes em IFN- $\gamma$  e IL-4 eliminaram a *Giardia* normalmente, sugerindo que nenhuma das respostas, Th1 ou Th2, são absolutamente necessárias para a eliminação do parasito (Singer e Nash, 2000b).

## 1.9.2 - Imunidade adaptativa

Se os mecanismos da resposta inata não forem eficientes para eliminar a *Giardia*, ela

---

<sup>11</sup> Na atuação do sistema imune contra corpos estranhos (vírus, bactérias, fungos, protozoários, entre outros), dois diferentes mecanismos são utilizados. O primeiro é o sistema inato que atua de forma indiscriminada, fagocitando as partículas e organismos estranhos. A segunda é uma resposta imune especializada, adaptativa ou adquirida, sob a ação de citocinas. Citocinas são glicoproteínas sintetizadas - e liberadas apenas durante a resposta imune - por macrófagos, mastócitos, linfócitos, células dendríticas, entre outras células do sistema de defesa, que induzem os linfócitos B a produzirem anticorpos que irão neutralizar antígenos. As interleucinas (IL) estão entre os principais tipos de citocinas, podendo agir como mediadores e reguladores da imunidade inata (IL-1, IL-6, IL-12, IL-16, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , INF- $\beta$ ) ou como mediadores e reguladores da imunidade adaptativa (IL-2, IL-4, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ).

<sup>12</sup> IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que promove uma resposta celular inata, induzindo células B a formarem IgA.

continua aumentando sua população, expressando e liberando antígenos, o que acaba por desencadear uma resposta imune adaptativa (Janeway *et al.*, 2008).

Hospedeiros imunocompetentes, tanto humanos quanto modelos experimentais, levam 3-5 semanas pós-infecção para eliminar os parasitos, correspondendo ao estabelecimento da imunidade humoral (Singer e Nash, 2000a; Langford *et al.*, 2002; Eckmann, 2003; Velazquez *et al.*, 2005), ficando refratários à infecções posteriores ou pelo menos com significativa redução dos danos no epitélio (Solaymani-Mohammadi e Singer, 2010).

Hospedeiros humanos e não humanos produzem anticorpos séricos (IgG, IgM e IgA anti-*Giardia*) e intestinais (IgA anti- *Giardia*) contra os trofozoítos presentes no intestino. Neste último caso, a IgA diminui a capacidade de adesão dos trofozoítos à superfície das células do epitélio intestinal (Smith *et al.*, 1981; Heyworth e Vergara, 1994; Hernández-Sánchez *et al.*, 2008), agindo especificamente nas  $\delta$ -giardinas (proteínas presentes no disco adesivo), o que é seguido por um aumento do peristaltismo intestinal, levando à expulsão destes organismos.

Além dos anticorpos circulantes, o aumento da frequência de giardiase em indivíduos com alterações na imunidade humoral, particularmente nas deficiências de IgA e IgG, sugere que estas imunoglobulinas participem da eliminação de *Giardia* (Baqai *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de resposta imune para o controle da infecção por *Giardia* pode estar associado ao reconhecimento de antígenos relevantes do parasito (Faubert, 2000).

A resposta adaptativa contra os protozoários ocorre após a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, via MHC classe II para as células T (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Os macrófagos são células importantes na defesa contra protozoários e bactérias intracelulares. A resposta mediada pelas células T é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra os protozoários. As células T podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células TCD8<sup>+</sup> ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares. A população de células TCD4<sup>+</sup> (T helper) é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: as células Th1 e Th2 (Mosmann e Coffman, 1989). É fundamental o entendimento de que tanto a resposta Th1 como a resposta Th2 são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e Th17 contra bactérias extracelulares. Essas respostas são

também antagônicas, desde que o IFN- $\gamma$  modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada. Adicionalmente, as células regulatórias da resposta imune que expressam as moléculas CD4 e CD25 (Tr) e produzem IL-10 e/ou TGF- $\beta$  (Tr1 ou Th3) estão envolvidas em modular a resposta imune, impedindo ou diminuindo as consequências das reações de hipersensibilidade e das doenças autoimunes (Mills e McGuirk, 2004).

Embora nas infecções causadas por agentes intracelulares, uma resposta imune desviada para o polo Th2 seja maléfica, porque aumenta a susceptibilidade às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito, o conceito de que uma potente resposta Th1 seja protetora deve ser visto com reserva (Machado *et al.*, 2004). Em várias doenças causadas por protozoários, existem evidências de que a resposta imune exacerbada está envolvida no dano tecidual: na amebíase é dependente da ação de neutrófilos (Ventura-Juarez *et al.*, 2003); na doença de Chagas é mediado por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Gomes *et al.*, 2003); uma maciça produção de TNF- $\alpha$  e NO é documentada na patogenia da malária cerebral (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

Sendo assim, a avaliação de uma resposta imune contra uma doença infecciosa tem que ser medida sempre em relação ao tipo de agente agressor.

## **1.10 Patogenia**

Nem todos os aspectos dos mecanismos etiopatogênicos na giardíase foram elucidados ou bem demonstrados (Cotton *et al.*, 2011), mas vários estudos apontam que fatores relacionados ao parasito (cepa, carga infectante) e ao hospedeiro (dieta, associação à microbiota intestinal, pH do suco gástrico, concentração de sais biliares, resposta imune, estado nutricional e coinfeção) participem diretamente da patogênese da giardíase (Farthing, 1997; Faubert, 2000; Singer e Nash, 2000b). Sendo assim, as relações estabelecidas entre parasito e hospedeiro são determinantes para a manifestação da doença. As cepas de *Giardia* possuem diferentes constituições genéticas que podem estar relacionadas à capacidade de produzir, ou não, as diferentes alterações morfológicas do intestino (Tako *et al.*, 2013).

Ao perdurar as condições favoráveis relacionadas ao hospedeiro e ao parasito, que beneficiam o desenvolvimento e a reprodução da *Giardia*, a população do parasito tende a crescer (Hollm-Delgado *et al.*, 2008; Haque *et al.*, 2009; Ward, 2009; Siwila *et al.*, 2010).

O fato de não haver invasão tissular (epitélio intestinal ou tecidos circundantes) ou na corrente sanguínea pelos trofozoítos ou ainda, qualquer infiltração evidente de células inflamatórias (com exceção de um pequeno aumento dos linfócitos intraepiteliais), não exime o parasito de determinar alterações morfológicas e fisiológicas. Má absorção intestinal e diarreia, sintomas frequentemente presentes na giardíase, causados pelas anormalidades epiteliais, são muito semelhantes a outras doenças entéricas como a enterite bacteriana, doença de Crohn, doença celíaca, entre outras (Rubin *et al.*, 1996; Buret *et al.*, 1998).

Alguns estudos relacionam a infecção pela *Giardia* a distúrbios crônicos do funcionamento gastrointestinal, incluindo a síndrome do intestino irritável (SII), e a patologias extraintestinais, mesmo que os parasitos sejam encontrados apenas no interior do trato gastrointestinal (Morken *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010).

Uma hipótese inicial sobre a patogênese sugeria que o parasito devia interferir na dinâmica intestinal, funcionando como uma barreira mecânica à absorção de nutrientes (Farthing, 1997). Isso é improvável, porque o tamanho do parasito (12x5  $\mu\text{m}$ ), a dose infecciosa (dez a 100 cistos) e o tempo de crescimento sugerem que a área de colonização após 6 a 10 dias é extremamente pequena ( $\pm 0,1651\text{m}^2$ ) em comparação com a superfície intestinal ( $\pm 250\text{m}^2$ ) (Guyton e Hall, 2006).

De todo modo, mesmo com a eliminação intermitente de cistos, a colonização do intestino pelos trofozoítos aumenta a ponto de alterar a arquitetura da mucosa intestinal, o que pode estar relacionado aos casos sintomáticos. A atrofia das microvilosidades e das criptas de Lieberkühn afetam a atividade de enzimas digestivas, tais como lipases, proteases e dissacaridases (Scott *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2004) podendo interagir com outros mecanismos patológicos, determinando os diferentes quadros clínicos decorrentes da infestação pela *Giardia*. Todavia, não se pode afirmar que o encurtamento das microvilosidades e os quadros inflamatórios estejam obrigatoriamente relacionados aos sintomas e posterior eliminação do parasito (Nash *et al.*, 1987).

Por meio do disco adesivo (ou ventral), os trofozoítos aderem fortemente na superfície epitelial não alterando, na maioria dos casos, a conformação das vilosidades. Em alguns casos inespecíficos, a adesão do trofozoíto nas vilosidades intestinais provoca alterações que vão desde o achatamento até a atrofia das microvilosidades (Ventura *et al.*, 2013). Diversas moléculas de superfície estão envolvidas e parecem ser determinantes nesta interação, com destaque para as giardinas alfa, beta, delta e gama, bem como uma complexa rede de

proteínas contráteis (Peattie *et al.*, 1989; Peattie, 1990; Nohria *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 2009; Jimenez-Cardoso *et al.*, 2009). As implicações dessas moléculas na patogênese e/ou imunidade permanecem desconhecidas. De todo modo, é a partir desta adesão que são desencadeados uma série de eventos patofisiológicos que culminam nos diversos quadros clínicos (Cotton *et al.*, 2011). Nestes eventos incluem-se elevadas taxas de apoptose de enterócitos, disfunção da barreira intestinal, ativação de linfócitos, encurtamento das microvilosidades, deficiência de dissacaridases, má absorção intestinal, hipersecreção de íons e aumento do trânsito intestinal (Cotton *et al.*, 2011).

Experimentos “in vitro” indicaram que *G. lamblia* reorganiza o citoesqueleto de F-actina e  $\alpha$ -actina em células duodenais humanas e que isso reduz a resistência elétrica transepitelial, com aumento da permeabilidade intestinal (Teoh *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2002). Além disso, a coincubação “in vitro” induziu apoptose e ruptura das “tight junctions” em monocamadas de células intestinais humanas (Chin *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002), embora a observação clínica de humanos não confirme a ruptura das “tight junctions” (De Magistris *et al.*, 2003).

Alguns dados clínicos mostram que a giardíase humana está relacionada à diminuição das funções digestivas e de absorção de glucose, sódio e água pelas células intestinais e redução da atividade das dissacaridases devido à redução da superfície de absorção epitelial (Farthing, 1997; Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller e Von Allmen, 2005; Gascon, 2006). As conclusões de Troeger *et al.* (2007) mostraram pela primeira vez que, além da má absorção, giardíase crônica em humanos pode causar hipersecreção de cloreto. A combinação de má absorção e secreção de eletrólitos parece ser responsável pelo acúmulo de líquido no lúmen intestinal durante a infecção. Todavia, os mecanismos responsáveis por essas anormalidades epiteliais permanecem pouco compreendidos (Buret, 2007).

Alguns autores relacionam a contaminação pela *Giardia* à hipogamaglobulinemia<sup>13</sup> e deficiência de IgA anti-*Giardia* que é induzida na mucosa intestinal. Os anticorpos IgA reconheceriam proteínas presentes no disco adesivo dos trofozoítos, dificultando a adesão do parasito no epitélio intestinal. A participação ativa de IgA anti-*Giardia* poderia garantir um microambiente propício para a cura da doença ou pelo menos manter uma baixa carga parasitária. Talvez esta situação seja a responsável pelos casos de o parasitismo permanecer assintomático, com cura espontânea ou, ainda, a cronificação da infecção no caso de

---

<sup>13</sup> (=ICV imunodeficiência comum variável; alteração da imunidade caracterizada por baixos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA).

deficiência de IgA (Li *et al.*, 2004).

Além das imunoglobulinas, a participação de mecanismos T dependentes e de células como monócitos, macrófagos e granulócitos na destruição dos trofozoítos também têm recebido atenção dos pesquisadores. A depleção de Lif T CD4<sup>+</sup> promove a persistência da infecção (Scott *et al.*, 2004) e aumento de cistos nas fezes, enquanto agressões nas microvilosidades e deficiências das dissacaridases parecem ser mediadas pelas células T CD8<sup>+</sup> (Faubert, 2000; Eckmann, 2003; Scott *et al.*, 2004). Animais com as funções dos linfócitos T comprometidas não apresentam alterações nas microvilosidades nem tão pouco são capazes de eliminar os parasitos (Scott *et al.*, 2000; Faubert, 2000; Eckmann, 2003) indicando que apenas a adesão dos trofozoítos ou sua virulência não são suficientes para causar o mau funcionamento intestinal. Há evidências de que os mastócitos também atuem no controle da infecção, modulando a resposta imune específica. Apenas os animais capazes de desenvolver uma resposta linfoproliferativa evoluem para a cura (Meeusen e Balic, 2000).

Por outro lado, tem sido constatado, tanto em infecções humanas quanto em animais de experimentação, um aumento de linfócitos intraepiteliais, (devido ao reconhecimento de antígenos liberados pelos trofozoítos) antes mesmo que alterações na mucosa intestinal sejam detectadas, e que essa taxa de infiltração linfocitária estaria positivamente relacionada ao grau de má absorção intestinal. Os linfócitos T provocariam uma retração das microvilosidades levando ao quadro de deficiência de dissacaridases e má absorção associadas aos quadros de diarreia (Buret *et al.*, 2002; Müller e von Allmen, 2005; Gascon, 2006).

Outro possível fator agressivo para a mucosa intestinal seriam substâncias secretadas ou excretadas pelo parasito que poderiam atuar como toxinas que degradam as microvilosidades (Buret *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002).

Uma explicação para os casos de esteatorréia é o acúmulo de gordura na luz intestinal devido a uma cadeia de eventos: parasitismo intestinal, baixa efetividade imunológica, alta carga parasitária, atapetamento da mucosa intestinal, degradação da superfície absorptiva do intestino, diarreia persistente (Voltarelli e Donadi, 2008). Outras hipóteses que explicam a interferência na absorção de gorduras na mucosa intestinal são que a irritação superficial da mucosa poderia causar uma perturbação funcional do aparelho digestivo, acelerando o trânsito, e que fenômenos alérgicos ou hipersensibilidade induzida pelo parasito poderiam fornecer outra explicação (Voltarelli e Donadi, 2008).



### 1.11 Sinais e sintomas

Uma característica marcante na giardíase é a apresentação irregular dos sintomas clínicos. Vários fatores têm sido propostos para explicar a variabilidade da doença, tais como a integridade do sistema imunitário, idade e estado nutricional do hospedeiro, linhagem ou genótipo do parasito, carga parasitária e, possivelmente, coinfeções (Farthing, 1997; Faubert, 2000; Singer e Nash, 2000b).

Na maioria dos casos a giardíase é uma doença assintomática, ocorrendo principalmente em crianças.

Os pacientes sintomáticos exibem os primeiros sintomas de seis a 15 dias após a infecção. A duração média da doença é de seis semanas, variando de uma a 30 semanas. Na fase aguda, duram de dois a quatro dias; em infecções crônicas podem durar várias semanas (Nash *et al.*, 1987; Flanagan, 1992; Farthing, 1997).

O sintoma mais observado é a diarreia, em diferentes intensidades. Pode variar entre quadros de enterite branda ou aguda e autolimitante, até quadros de diarreia crônica, persistente e debilitante com esteatorréia, dor abdominal, inchaço, má absorção de nutrientes e perda de peso (Meyer e Radulescu, 1979; Ungar *et al.*, 1984; Goldin *et al.*, 1990).

A má-absorção, por sua vez, é uma causa frequente de anemia ferropriva<sup>14</sup>, devido à absorção insuficiente de ferro e das perdas hemáticas (Fauci *et al.*, 2008). No caso das crianças, que estão em fase de crescimento e, portanto, possuem uma alta demanda fisiológica por ferro, o aporte insuficiente deste íon aumenta muito o risco de apresentarem este tipo de anemia (al Agha e Teodorescu, 2000).

Nos quadros mais graves, os pacientes não respondem ao tratamento específico, mesmo os imunocompetentes (Farthing, 1992). Os sintomas mais frequentes são: evacuações líquidas ou pastosas, número aumentado de evacuações, mal-estar, cólicas abdominais e perda de peso. Os menos frequentes são perda de apetite, náuseas, vômitos, flatulência, distensão abdominal, febrícula, cefaleia e nervosismo. Outras complicações importantes causadas pela giardíase estão associadas à má absorção de gorduras e nutrientes, como vitaminas lipossolúveis (ADEK), vitamina B12, ferro, D-xilose, lactose, glicose e ácido fólico. Essas deficiências nutricionais raramente produzem danos sérios nos adultos, contudo em crianças podem ter efeitos graves e comprometer o seu desenvolvimento físico e cognitivo.

---

<sup>14</sup> Neste tipo de anemia a ingestão de ferro está menor que o mínimo necessário para as atividades do organismo.

Infelizmente, é nessa faixa etária que as influências exercidas pelas parasitoses tornam-se mais acentuadas (Cardoso *et al.*, 1995; Berkman, 2003; Simsek *et al.*, 2004; Koruk *et al.*, 2010; Ajjampur *et al.*, 2011; Buret, 2015).

O impacto clínico parece ser maior durante os três primeiros anos de vida e em indivíduos subnutridos ou imunodeficientes (Farthing, 1989). Frequentemente, a *G. lamblia* tem sido apontada como causa de distúrbio de crescimento entre as crianças (Goldin *et al.*, 1990), sendo a presença e a frequência da diarreia, duração da infecção e oportunidade de re-infecção fatores essenciais no depauperamento físico e mental dessas crianças (Thompson *et al.*, 1993), diretamente relacionado à redução da absorção intestinal.

### 1.12 Metabolismo da *Giardia lamblia*

A forma cística tem uma taxa metabólica de 10 a 20 % do observado nos trofozoítos.

Ao contrário de outros eucariotos, que primariamente metabolizam carboidratos aerobicamente, *Giardia* spp. (assim como *Trichomonas* spp. e *Entamoeba* spp.) são organismos caracterizados pela ausência de mitocôndrias e, portanto, dependem da fosforilação oxidativa mediada por citocromos (Adam, 2001) para a produção de energia. Eles podem realizar o metabolismo aeróbico ou anaeróbico, dependendo da concentração de oxigênio do ambiente, embora sejam predominantemente fermentativos (mesmo na presença de O<sub>2</sub>), e da taxa de glicose presente no meio. O nível de fosforilação do substrato modula a glicólise e a geração de ATP (adenosina trifosfato). A conversão do piruvato a acetil-coenzima A é catalisada pela enzima piruvato ferredoxina oxireductase (Townson *et al.*, 1996), que utiliza a ferredoxina e NAD<sup>+</sup> (nicotidamina adenina dinucleotídeo) comoceptor de elétrons, em substituição ao complexo piruvato desidrogenase (presente nos organismos aeróbicos). O complexo enzimático piruvato ferredoxina oxireductase (PFOR) e a proteína ferredoxina são primordiais para a produção de energia em microorganismos anaeróbicos. A glicose não é totalmente oxidada formando acetato, alanina, etanol e CO<sub>2</sub>. O balanço final dos produtos é dependente da tensão de O<sub>2</sub> e da concentração de glicose no meio (Adam, 2001).

Em condições estritamente anaeróbicas, o metabolismo da glicose é predominante e a alanina é o principal produto do metabolismo de carboidrato (Edwards *et al.*, 1989; Paget *et al.*, 1990; Paget *et al.*, 1993). Porém, na adição de uma quantidade mínima de O<sub>2</sub> (concentrações abaixo de 0,25 µM), a produção de etanol é estimulada e a produção de alanina é inibida (Paget *et al.*, 1993). Aumentando-se a concentração de O<sub>2</sub>, tanto a produção

de alanina quanto a produção de etanol serão inibidas. Para concentrações de O<sub>2</sub> acima de 0,46 µM, a produção de alanina é completamente inibida, sendo acetato e CO<sub>2</sub> os produtos predominantes do metabolismo energético.

Assim como os carboidratos, os aminoácidos são importantes componentes no metabolismo energético da *Giardia*. Apenas alanina e valina são sintetizadas pelos trofozoítos. Todos os outros aminoácidos são absorvidos do hospedeiro. O uso de aspartato, alanina e arginina de meios extracelulares, bem como o metabolismo glicose-independente, comprovam a importância dos aminoácidos na produção de energia desse parasito (Schofield *et al.*, 1990; Mendis *et al.*, 1992).

*G. lamblia*, como outros protozoários patogênicos, depende do armazenamento de purina e pirimidina, principalmente por não possuírem vias de síntese para essas bases nitrogenadas. Além disso, a síntese de DNA (ácido desoxiribonucléico) nesses organismos, depende de desoxinucleotídeos exógenos, já que trofozoítos de *G. lamblia* são deficientes na enzima ribonucleotídeo redutase (Baum *et al.*, 1989).

### 1.13 – Tratamento

Diversos fármacos podem ser utilizados para tratar a infecção por *Giardia*, sendo que para os casos humanos a opção de escolha é quase exclusivamente os nitroimidazóis. Estes compostos têm grande uso clínico por causa de sua alta seletividade para anaeróbios e baixa toxicidade para aeróbios.

Na classe dos nitroimidazóis, utilizados como quimioterápicos para o tratamento da infecção por *G. lamblia*, inclui-se o metronidazol, tinidazol, ornidazol, e secnidazol (Busatti *et al.*, 2009; The Medical Letter; 2010). Alternativas para estes medicamentos incluem paromomicina<sup>15</sup>, quinacrina<sup>16</sup>, e furazolidona<sup>17</sup> (Busatti *et al.*, 2009).

Lançado na França em 1960, o medicamento de marca Flagyl®, cujo princípio ativo é o metronidazol, é um agente microbicida de amplo espectro e com atividade contra bactérias anaeróbicas e protozoários. O metronidazol é rápido e completamente absorvido após a administração oral, penetrando nos tecidos e secreções corporais. É ativado metabolicamente,

---

<sup>15</sup> Antibiótico oligossacarídeo produzido por vários STREPTOMICES. Fonte: Biblioteca virtual em saúde.

<sup>16</sup> Derivado da acridina, anteriormente muito utilizado como antimalárico, mas superado pela cloroquina em anos recentes. Também tem sido utilizado como anti-helmíntico e no tratamento da giardíase e efusões malignas. É usado em experimentos de biologia celular como inibidor da fosfolipase A2. Fonte: Biblioteca virtual em saúde.

<sup>17</sup> Derivado do nitrofurano e com atividade antiprotozoária e antibacteriana. Afurazolidona atua por inibição gradual de monoamino oxidase.

ou seja, reduzido, liga-se covalentemente à molécula de DNA do parasito, promovendo a perda da estrutura helicoidal e desestabilização molecular do DNA, com subsequente morte do trofozoíto. Sua metabolização é preferencialmente no fígado e excreção pela urina (Lau *et al.*, 1992; Tracy e Webster, 1996).

Entretanto, devido ao fato de existirem diferentes linhagens, isoladas de diferentes hospedeiros humanos, de diferentes localidades do mundo, era de esperar que a resposta ao tratamento também fosse diferente. A sensibilidade dos parasitos ao fármaco variava da cura até um significativo número de casos refratários. Apesar disso, hoje, o metronidazol é a droga mais utilizada no tratamento da giardíase em todo o mundo, inclusive nos EUA (Gardner e Hill, 2001; Busatti *et al.*, 2009).

Além dos nitroimidazólicos, encontram-se também disponíveis para o tratamento da giardíase os benzimidazólicos e nitrofuranos. Porém, estes grupos de medicamentos nem sempre são efetivos contra os parasitos (Gardner e Hill, 2001; Busatti *et al.*, 2009).

#### **1.14 Modelo experimental**

A compreensão de fenômenos naturais é facilitada pela utilização de modelos animais que devem, obrigatoriamente, permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos que estão sendo estudados (Ferreira *et al.*, 2003). Ou seja, o modelo experimental deve ser, funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar (Hochman *et al.*, 2004).

Existem diversos modelos experimentais descritos cuja escolha repercute na validade dos resultados alcançados, bem como as condições de manejo da espécie utilizada. Além disso, quanto maior a uniformidade dos animais em relação às variáveis ambientais, genéticas e experimentais, menor será a quantidade amostral mínima de animais necessários para a pesquisa ser realizada. Assim, os animais utilizados em experimentação podem ser classificados quanto ao “status” ou condição sanitária, genotípica e como modelo experimental (Ferreira *et al.*, 2005).

Dentre os modelos experimentais propostos para estudar o desenvolvimento e a patogenia da infecção por *G. lamblia*, os gerbils (*M. unguiculatus*) permitem obter bons resultados devido ao seu tamanho, facilidade de manipulação, susceptibilidade à inoculação e, principalmente, devido à semelhança entre o padrão da giardíase nesses animais e em

humanos (Visvesvara *et al.*, 1988).

Vários outros estudos vêm utilizando o gerbil como modelo experimental para tratar de diferentes temas que possam contribuir para o entendimento da patofisiologia das infecções por *Giardia*, tratamento e estudo de novas drogas (Leitch *et al.*, 1993; Farthing, 1997; Venkatesan *et al.*, 1997; Hardin *et al.*, 1997; Faubert, 2000; Scott *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2004; Humen *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012; Ventura *et al.*, 2013; Busatti *et al.*, 2013; Tejman-Yarden *et al.*, 2013; Quihui-Cota *et al.*, 2014). Desse modo, nos sentimos confortáveis em empregar o gerbil como modelo experimental em nosso estudo.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A *Giardia lamblia* é um protozoário negligenciado que aparentemente tem um ciclo de vida simples, não invade tecido e responde relativamente bem ao tratamento. Apesar disso, produz anualmente milhões de casos sintomáticos (280 milhões de pessoas apresentam a doença sintomática, com cerca de 500.000 novos casos relatados a cada ano. Atinge importante parcela da população pobre de países subdesenvolvidos. A doença crônica causa síndrome de má absorção intestinal, que em crianças desnutridas contribui de forma substancial para o atraso no crescimento físico e desenvolvimento psicomotor. Nesses países, a giardíase deve ser analisada com especial cuidado, tendo em vista que pesquisas indicam que o nível de desenvolvimento econômico-social de diferentes regiões do mundo parece estar relacionado à ocorrência ou não dos quadros sintomáticos e, também, por ser considerada uma infecção reemergente, incluída em 2004 na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde.

Pouco se conhece sobre a fisiopatologia da doença e os dados disponíveis na literatura são muitas vezes controversos. Para o estudo das possíveis alterações no metabolismo humano, devido à infecção pela *Giardia* spp., utilizamos o recurso do modelo experimental animal. A utilização de modelos animais é uma importante alternativa para o estudo dos mecanismos envolvidos nas condições patológicas, bem como para o desenvolvimento de estratégias clínicas que possam minimizar os sinais e sintomas, possibilitando, ainda, um direcionamento para novas estratégias de intervenção terapêutica.

Dentre os modelos experimentais propostos para estudar o desenvolvimento da *Giardia* e a patogenia da infecção, os gerbils (*M. unguiculatus*) permitem obter bons resultados devido ao tamanho, facilidade de manipulação, susceptibilidade à inoculação e, principalmente, devido à semelhança entre o padrão da giardíase nesses animais e em humanos.

Nesse contexto, decidiu-se avaliar o perfil bioquímico, hematológico e imunológico de gerbils infectados com *G. lamblia* buscando evidenciar alterações metabólicas relacionadas ao desenvolvimento da doença. O reconhecimento das disfunções produzidas pela *G. lamblia* poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias para eliminação do parasito e também para o tratamento dos efeitos produzidos por ele.

### **3. OBJETIVOS**



### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar as alterações bioquímicas, hematológicas e imunológicas produzidas pela giardíase em gerbils (*M. unguiculatus*) experimentalmente infectados.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da infecção por *Giardia lamblia* sobre os níveis séricos de glicemia, insulina, proteínas totais, albumina, cálcio, transaminase glutâmica oxalacética (TGO ou AST), transaminase glutâmica pirúvica (TGP ou ALT), fosfatase alcalina, colesterol total, triglicérides, cortisol e proteína C reativa (PCR).
- Avaliar os efeitos da infecção por *Giardia lamblia* sobre os níveis séricos de ferro sérico, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas, “Red Cell Distribution Width” (RDW), leucócitos totais, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos.
- Avaliar o peso dos gerbils durante o curso da infecção.
- Avaliar os níveis séricos de IgG, IgE e IgA e IgA secretório durante o curso da infecção.
- Quantificar a expressão relativa do mRNA das citocinas TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-11, IL-12 e IL-17 no intestino delgado (duodeno).
- Avaliar alterações na altura das criptas e vilosidades, na quantidade de células de infiltrado inflamatório presentes na lâmina própria, e na quantidade de células caliciformes e conseqüente variação na produção de muco no decorrer da infecção.
- Avaliar se há diferenças nos parâmetros acima relativos aos grupos de machos e fêmeas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1 Tipo de estudo

Este é um estudo experimental de caso e controle, sem intervenções terapêuticas, desenhado para avaliar as alterações bioquímicas, hematológicas e imunológicas no hospedeiro, após infecção por *G. lamblia*.

#### 4.2 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o protocolo nº 342/2015 (Anexo 1).

#### 4.3 Cálculo do Tamanho Amostral

O cálculo da amostra utilizada no estudo, foi baseado em dados de parâmetros sanguíneos de ratos normais, seguindo a fórmula  $\Delta = (t_{\alpha, gl} * S) / \sqrt{n}$  (Sampaio, 2010).

$\Delta$  = 10% da média

S = desvio padrão

$t_{\alpha, gl}$  = valor tabelado (Tab. 2 A2) em função do grau de liberdade dos tratamentos e probabilidade do erro tipo I.

S = desvio padrão

IC = intervalo de confiança (os valores de S e IC previsto devem ser informados).

IC = Média  $\pm$   $\Delta$

n = número de animais por grupo

Para os dados de metabolismo, nos baseando nos resultados publicados no artigo de Gupta *et al.* (2002), utilizamos o resultado da dosagem média de triglicerídeos séricos para gerbils do grupo controle:

Média = 76,0 mg/dL

S = 15,0

$\Delta$  = 7,6

IC = 76,0  $\pm$  7,6

Usando-se a fórmula:  $\Delta = t_{\alpha, gl} * S / \sqrt{n}$

7,6 = 2,0 (tabelado) \* 15,0 /  $\sqrt{n}$

$\sqrt{n}$  = 2,0 \* 15,0 / 7,6

n = 16 animais / grupo

Para a determinação de Imunoglobulina G, nos baseando nos resultados publicados no artigo de Baldissera *et al.* (2014), utilizamos o resultado da dosagem média de IgA no soro de ratos do grupo controle:

$$\text{Média} = 71,0 \text{ mg/dL}$$

$$S = 15,3$$

$$\Delta = 14,2 \text{ (20\% da média)}$$

$$\text{IC} = 71,0 \pm 14,2$$

Usando-se a fórmula:  $\Delta = t\alpha, gl * S/\sqrt{n}$

$$14,2 = 2,0 \text{ (tabelado)} * 15,3 / \sqrt{n}$$

$$\sqrt{n} = 2,0 * 15,3 / 14,2$$

$$n = 5 \text{ animais / grupo}$$

#### 4.4 Biotério

Buscando obter respostas as mais fidedignas possíveis com os parâmetros avaliados, especialmente quando é utilizado o recurso do modelo animal, o controle de todas as variáveis a que os animais estão submetidos é fator determinante para o sucesso da pesquisa. Nesse intuito, foi feita uma intervenção estrutural e operacional do biotério do laboratório de amebíase e protozoários intestinais do ICB/UFMG. Foram criadas subdivisões espaciais (biotério de experimentação, quarentena e antessala) para um melhor acondicionamento e fluxo dos animais. A criação do “Protocolo Operacional Padrão (POP)” garantiu o correto manuseio dos animais, tanto buscando seu bem estar durante o tempo do experimento, quanto para impedir alguma contaminação cruzada que pudesse interferir na qualidade dos dados (Anexo 2).

#### 4.5 Modelo

Foram utilizados gerbils (*M. unguiculatus*) machos e fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas. Os animais foram obtidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos no Biotério do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais (LAPI).

Para assegurar que os animais estivessem livres de qualquer parasitose, antes do início do experimento, todos foram tratados por via subcutânea. Para a prevenção dos helmintos administrou-se uma solução injetável de Ivermectina 1% (0,1ml - 10µg para cada animal) e

para a dos protozoários administrou-se uma solução injetável de Albendazol (20mg por grama de peso corporal do animal). Após a administração dos antiparasitários aguardou-se 28 e 7 dias, respectivamente, antes de infectar os animais dando início à fase experimental. Para combater os ectoparasitos, quando da entrada dos animais na quarentena do biotério, a maravalha das gaiolas foi borrifada uma única vez com uma solução de Triatox<sup>®</sup>.

Após o período de quarentena, foram realizados exames fecais (EPF) dos animais para confirmar que não estivessem parasitados com nenhum parasito intestinal. Com a negatificação dos EPFs os animais foram transferidos da área de quarentena para a área de experimentação do biotério, sendo acondicionados em gaiolas individuais e entrando na rotina operacional do mesmo.

Após a infecção dos animais, as fezes foram coletadas a cada dois dias para a realização de EPF e acompanhamento do curso da infecção pela *G. lamblia*. Com o negatificação do EPF ao MO, realizou-se o coproantígeno para confirmar a cura dos animais.

#### **4.6 Cepa de *Giardia*, cultivo e inóculo**

A infecção por *G. lamblia* foi realizada utilizando-se trofozoítos da cepa Portland-1 (ATCC<sup>®</sup> 30888<sup>TM</sup>), genótipo A1 (Sedinova *et al.*, 2003), oriunda do LAPI do ICB/UFMG, onde é mantida em cultura axênica em meio TYI-S-33 (Diamond, 1978), modificado por Keister (1983) e suplementado com bile bovina.

A cultura é continuada pela realização de repiques a cada 72/96 horas, e os tubos mantidos na posição de 30° de inclinação, em estufa bacteriológica e sob temperatura de 37°C.

Os animais foram infectados por gavagem, usando-se uma cânula DELVO n° 15, acoplada a uma seringa de 1 mL, contendo 0,3 mL de suspensão de  $1 \times 10^6$  trofozoítos em meio de cultivo.

Os animais do grupo controle (não infectados) foram gavados apenas com 0,3 mL de meio de cultura.

#### **4.7 Coleta de dados**

A coleta de dados foi feita em três momentos distintos, com diferentes grupos de animais, devido à extensa quantidade de dados que foram coletados.

#### **4.8 Delineamento experimental (Anexo 3)**

Para avaliação do perfil bioquímico, hematológico e imunológico dos animais com giardíase, o experimento foi dividido em três fases. Na primeira fase foram utilizados 16 gerbils (8 machos e 8 fêmeas), na segunda fase foram utilizados 30 gerbils (15 machos e 15 fêmeas) e na terceira fase foram utilizados 38 gerbils machos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob controle de temperatura, fotoperíodo de 12h, livre acesso à água filtrada e dieta. Os animais da primeira fase foram mantidos durante o período de 12 meses e os animais da segunda e terceira fases foram sacrificados periodicamente. Os animais do primeiro grupo tiveram o sangue coletado em tubo eppendorff contendo EDTA, por punção da veia caudal, no tempo zero e a cada sete dias, até o 28º dia, quando, a partir de então, foi coletado sangue mensalmente, para testes bioquímicos e imunológicos. No segundo e terceiro grupos, os animais foram sacrificados no tempo zero e a cada sete dias, sendo coletado sangue, em tubo eppendorff contendo EDTA, para os testes bioquímicos e imunológicos, e fragmentos do intestino delgado e fígado para análise morfométrica. No terceiro grupo também foram feitos os testes hematológicos. As fezes dos animais do primeiro grupos foram coletadas a cada dois dias, por trinta dias, para identificação morfológicas dos parasitos, identificação de coproantígenos e dosagem de IgA secretório, e depois a cada trinta dias, por 1 ano. As fezes dos animais do segundo e terceiro grupos foram coletadas a cada dois dias, por 14 dias e depois a cada sete dias, por 21 dias, para dosagem de IgA, IgE e IgG secretório.

Para dosagem de expressão de citocinas, determinação do perfil hematológico, testes bioquímicos e morfometria (3ª fase) foram utilizados 38 gerbils, separados em seis grupos. O grupo 0 (G0) constituiu-se de controle; 5 animais foram sacrificados no dia 0, antes da infecção e dois animais foram sacrificados a cada 7 dias, até o 28º dpi. O grupo 1 (G1), sacrificado sete dias após a infecção. O grupo 2 (G2), 14 dias após a infecção. O grupo 3 (G3), 21 dias após a infecção. O grupo 4 (G4), 28 dias após a infecção. O grupo 5 (G5), 35 dias após a infecção. As fezes destes animais foram coletadas para confirmar a positividade da infecção e análise de IgA secretório. Os animais foram pesados duas vezes por semana.

#### **4.9 Análise estatística**

Para variáveis contínuas paramétricas utilizou-se, na correlação entre os grupos, o teste t-Student para amostras pareadas, ou a ANOVA paramétrica para medidas repetidas (teste de Wilk's Lambda) com teste de esfericidade de Mauchly, com teste de comparações

múltiplas, ou a ANOVA paramétrica de uma via (OneWay – ANOVA), com o teste de Tukey, dependendo da situação analisada.

Para as variáveis não paramétricas utilizou-se a ANOVA não paramétrica para medidas repetidas (ANOVA de Friedman), seguida de análise múltipla pareada utilizando-se o teste de Wilcoxon na comparação de diferenças entre os diversos pares.

Os dados categóricos são mostrados como proporção e percentuais, enquanto as variáveis contínuas são descritas como a média  $\pm$  desvio padrão.

Foi realizada análise de correlação entre as variáveis contínuas, na avaliação da evolução das mesmas ao longo do tempo. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas, em todas as análises.

Os dados foram analisados no programa SPSS versão 23.0.

#### **4.10 Necropsia dos animais**

Durante o período de experimentação (grupos 2 e 3) e após o período de experimentação (grupo 1), os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo uma solução de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg). Foi feito o exsanguinamento e abertura da cavidade peritoneal com incisão mediana, para a localização das vísceras.

#### **4.11 Coleta de fezes**

O material fecal foi coletado para avaliação morfológica em microscópio de luz. Fezes de cada animal foram diluídas em salina e avaliadas ao microscópio, sob aumento de 10 e 40 vezes, para observação de trofozoítos e/ou cistos de *G. lamblia*. Todo material fecal examinado ao microscópio foi também avaliado para antígenos fecais de *Giardia*, pelo método de coproantígenos (*Kit* IVD Research inc. GL2-96). Após negatização do exame de fezes, determinado por coproscopia e coproantígenos, em três coletas consecutivas, não houve mais coleta de fezes.

#### **4.12 Perfil bioquímico e de imunoglobulinas plasmáticas**

Para determinar o perfil bioquímico e das imunoglobulinas plasmáticas IgG, IgE e IgA anti-*Giardia* dos animais infectados, o sangue foi coletado no tempo 0 e, semanalmente,

durante o primeiro mês da infecção e, mensalmente, por mais 11 meses. Foram avaliados: glicemia, albuminemia, colesterolemia, trigliceridemia, proteínas totais, as enzimas aspartato amino transferase (TGO/AST) e alanina amino transferase (TGP/ALT), cálcio, fosfatase alcalina, insulina, cortisol e proteína C reativa, seguindo protocolo do fabricante, utilizando-se *kits* da Labtest (Lagoa Santa, Brasil).

Para dosagem das imunoglobulinas plasmáticas foi utilizada a reação de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Buscando aumentar a sensibilidade da reação, as placas foram sensibilizadas com 1 µg de extrato solúvel, obtido de uma mistura de cepas axênicas isoladas no Brasil e de cepas padrão como Portland-1 e GS/M Clone H7, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC). O extrato foi obtido por três ciclos de congelamento (N<sub>2</sub> líquido) e descongelamento (banho-maria a 37°C) dos trofozoítos em uma solução de PBS, acrescida de inibidores enzimáticos). As proteínas solúveis foram obtidas por centrifugação, 5 min a 1000g, e a concentração determinada pelo método de Bradford (1976) e estocadas a -20°C até o uso. Todos os passos da reação foram previamente padronizados, utilizando-se soros de animais inoculados com 10<sup>6</sup> trofozoítos como controle positivo.

As placas foram sensibilizadas com 1 µg do antígeno e lavadas uma vez com PBS-Tween 20 (0,05%). Em seguida, 100µl dos soros (diluídos em PBS-Caseína a 2%, na diluição única de 1:100, definida por titulação prévia), foram distribuídos em cada well, duplicata em. Após incubar por uma hora, à temperatura ambiente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 20, sendo adicionado, em seguida, 100µl de conjugado anti-IgG de gerbil, ou anti-IgE e anti-IgA de camundongo marcado com peroxidase (Sigma), em cada poço. A diluição do conjugado foi de 1:1000, em PBS-Caseína, conforme o título previamente estabelecido e seguido de uma nova incubação de uma hora, à temperatura ambiente. Terminada a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 20. Finalmente, 100 µL do substrato (2 µg de orto-fenilendiamino-OPD, em 10ml de solução tampão citrato-fosfato e 30µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-30vol) foi adicionado às placas com incubação por 45 min a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 30µl de ácido sulfúrico 4M, em cada orifício. A reação produzida foi medida em espectrofotômetro, a 490nm. Para determinação do ponto de corte, utilizou-se 10 soros de animais sem infecção, testados na diluição 1:100. O ponto de corte foi definido como a soma da média das absorvâncias dos 10 soros negativos mais dois desvios padrão (X+2DP).

Foi também avaliado IgA secretora (sIgA) no material fecal dos animais ensaiados.



Para tal, 0,1g de fezes de cada animal foi colocada em microtubos de poliestireno, contendo 0,5 ml de PBS e 1 mM de PMSF. Após incubação durante 1h, a 4°C, os tubos foram agitados e centrifugados (10.000g por 10 min). O sobrenadante (extrato fecal) foi recolhido e armazenado a -20°C, até o uso.

Os níveis de IgA secretora nos extratos fecais para *Giardia* foram determinados por ELISA, seguindo protocolo previamente descrito (Amorin *et al.*, 2010), com modificações. Todos os passos da reação foram previamente padronizados, utilizando-se extratos fecais de animais inoculados com 10<sup>6</sup> trofozoítos, como controle positivo. Como controle negativo, utilizaram-se extratos fecais de animais não infectados por *G. lamblia*. As microplacas foram cobertas com o antígeno, produzido no laboratório para o teste de sorológico, por 12 horas a 4°C e bloqueados com 100 µL/poço de 0,5% de caseína, em PBS, durante 1h, a 37°C. O extrato fecal (diluído 1:5 em PBS-T) aplicado na placa (50 µL/poço) e incubado durante 1h, a 37°C. Em seguida, o anticorpo IgA “anti-mouse” biotilado (diluído 1:1000 em PBS, Caltag Lab Inc.) foi adicionado e incubado, por 1h, a 37°C. Após esta reação, a placa foi incubada 30 min, a 37°C, com estreptavidina peroxidase (diluído 1:1000 em PBS-T). A reação foi revelada com TMB e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e finalizada com 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os valores de DO (Densidade ótica) foram determinadas a 450 nm e o ponto de corte foi calculado como descrito acima, para avaliação de imunoglobulinas no soro.

#### **4.13 Perfil hematológico**

Para determinar o perfil hematológico dos animais durante o experimento, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia caudal e por exsanguineamento, após abertura da cavidade peritoneal com incisão mediana. A amostra de sangue periférico foi coletada e homogeneizada tubo contendo EDTA (microcoleta – 0,5ml). Confeccionou-se esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro de modo que pudessem ser corados após a fixação em temperatura ambiente, usando-se corático rápido do tipo Panótico. O esfregaço sanguíneo foi avaliado em microscopia optica de imersão, objetiva 100X. Realizou-se contagem diferencial, contagem global por estimativa e avaliação morfológica de leucócitos, avaliação morfológica e contagem global de plaquetas e a avaliação morfológica de hemácias. A contagem global por estimativa de leucócitos serve como monitoramento da contagem global de leucócitos liberada pelo hemocitômetro automático. Microhematócrito em microcentrifuga de hematócrito com tubos capilares, para comparação e validação do Volume Globular liberado pelo hemocitômetro. Processamento da amostra para contagem global de hemácias,

dosagem de hemoglobina, hematócrito, contagem global de leucócitos, cálculo dos índices hematímétricos em hemocitômetro automático – pocH-100iV Diff™ analisador hematológico da Roche/Sysmex, com calibração para amostras de roedores. (vide manual no site do fabricante).

#### 4.14 Perfil de citocinas

Para determinar o perfil de citocinas, 38 animais foram inoculados formando seis grupos (G): G0, sacrificados antes do inoculo; G1, sete dias após o inóculo; G2, duas semanas após o inoculo; G3, três semanas após o inoculo; G4, quatro semanas após o inoculo; G5, cinco semanas após o inoculo. Todos os animais foram exangüineados, obtendo-se o sangue total para determinação do perfil hematológico e soro para a determinação do perfil bioquímico e sorologia.

Após a coleta do sangue, o intestino delgado foi dividido em duas porções, a proximal ao duodeno foi destinada à extração de RNA para avaliação da expressão de citocinas (não existem kits de ELISA para gerbil para dosagem direta de citocinas). A outra porção medial do duodeno foi usada para processamento de cortes histológicos e análise morfométrica.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIZOL, de acordo com protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrometria usando o equipamento NanoDrop. Um µg de RNA total foi usado em reações de transcrição reversa para produção de cDNA usando-se o kit “High Capacity” (Life Techonologis), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA (2µL) obtido foi usado para a quantificação da expressão das citocinas usando-se o kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Techonologis). As citocinas e os respectivos iniciadores usados são apresentados na tabela 2.

Para quantificação relativa da expressão gênica das amostras de cDNA, a amplificação das citocinas foi feita por qPCR. Para normalização dos dados da expressão, utilizou-se a amplificação do gene Gapdh que é gene de referência. Para obtenção dos dados a nível relativo de expressão (NRE), empregou-se o método derivado do RQ (*relative quantification*) =  $2^{\Delta\Delta Cq}$ , descrito por Hellemans *et al.* (2007) usando a equação:

$$NRE_x = \frac{[E_x]^{\Delta Cq_x (Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}]^{\Delta Cq_{ref} (Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}}}$$

Tabela 2 – Citocinas e respectivos iniciadores utilizados para extração de RNA.

<i>IL-12p40</i>	F	GTACTCAGTGACGTGCCAG
	R	CATATTTATTCTGCTCCTGTG
<i>IL-10</i>	F	CATGGGTCTTGGGAAGAG
	R	AATGAAGTGGTTGGAGAATG
<i>TGF-β</i>	F	GCTACCACGCCAACTTCTG
	R	GCCCGGGTTGTGTTGGTTG
<i>IFN-γ</i>	F	CCATGAACGCTACACACTG
	R	ATTTTCTATTTCTTCAATGATTG
GAPDH	F	CTGGCATGGCCTTCCGAG
	R	CAGGTTTCTGCAGTCGGC
IL-1B	F	ACACGGTGACACAAGCAGC
	R	ATCACACAGGACAGGTACAG
IL-4	F	GGGTGCTCCGCAAATTTTAC
	R	CTGAGGACCCCGGAGTTG
IL-18	F	TGGCTGTAACCCTCTCTG
	R	TCAATATTTTCAGGTGGATTC
TNF-α	F	CTCCCCAGAAGTCGGC
	R	ACAGAAGAGCGTGGTGGC
IL-6	F	AGGATCCAGGTCAAATAGTC
	R	CGTCTGTGACTCCAGTTTC
IL-5	F	GACCTTGATACAGCTGTCC
	R	TCCAATGCACAGCTGGTG
IL-17	F	CTCGGACTACCTCAACCG
	R	CGGCAGCTGGCTTCCAAG
IL-11	F	CGCCTGGTCCTTATCGTGC
	R	TGCACGAGGGTCTGGAGAG

Os resultados foram expressos graficamente usando média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de mRNA de cada citocina normalizado pelo GAPDH, para cada grupo experimental.

#### 4.15 Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal

Durante a necropsia foi coletada a porção proximal do intestino delgado (extensão de 6 cm), devido à maior colonização pelos trofozoítos de *Giardia*, que foi aberta longitudinalmente e dividida em dois fragmentos para fixação em formol tamponado 10%, pH 7,2. Após o período de fixação, todos os fragmentos coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina, para obtenção de cortes com 4 µm de espessura. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E).

Todos os cortes histológicos da porção proximal do intestino delgado corados com H&E foram visualizados pela objetiva de 4X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany),

para a digitalização aleatória de 30 vilosidades intestinais, por meio da microcâmara SANSUNG SDC-415 (Korea). A altura das vilosidades foi calculada através do software KS400 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. A base das vilosidades foi delimitada manualmente utilizando-se ferramentas do software; todos os pixels com tons de violeta, vermelho e bonina foram selecionados para criação de uma imagem binária e a altura das vilosidades foi calculada automaticamente.

Para o cálculo da área ocupada pelo infiltrado inflamatório nas vilosidades intestinais, foram utilizados os cortes histológicos corados com H&E. As lâminas foram visualizadas pela objetiva de 20X do microscópio Axiolab para a digitalização aleatória de 30 imagens intestinais por meio da mesma microcâmara descrita previamente. Uma área total de  $125000 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  da mucosa foi analisada para cada caso. Algoritmos do software KS400 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foram utilizados para o processamento e segmentação das imagens, definição das condições morfométricas, contagem das células e o cálculo da área da lâmina própria. A segmentação permitiu selecionar os núcleos de todos os tipos de células presentes na lâmina própria da mucosa intestinal e excluir o citoplasma celular e outras estruturas presentes nos cortes histológicos. Por esse processo, uma imagem binária foi criada e os núcleos de todos os tipos celulares presentes na mucosa antral foram contados. Posteriormente, todos os pixels da lâmina própria foram selecionados para se obter uma outra imagem binária para calcular a área em  $\mu\text{m}^2$ .

Para o cálculo do número de células caliciformes presentes nas vilosidades intestinais, foram utilizados os mesmos cortes histológicos citados anteriormente. As lâminas foram visualizadas pela objetiva de 20X do microscópio Axiolab, para a quantificação aleatória de 30 imagens intestinais, por meio da mesma microcâmara descrita previamente.

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

#### **4.16 Reação imunohistoquímica e análise quantitativa para trofozoítos**

Os cortes para processamento em imunohistoquímica foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando-se os cortes em solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  40vv a 0,2%, em 200 ml de PBS, por 20 minutos. Os sítios de ligação inespecífica foram

bloqueados incubando-se os cortes com soro de cabra diluído a 1:40, por 40 minutos. As lâminas foram incubadas com soro policlonal anti-*G. lamblia* diluído a 1:1000 (produzido nos Laboratórios de Amebíase e Protozoários Intestinais/Depto Parasitologia e de Protozooses/Depto Patologia Geral) e, em seguida, incubados com IgG biotinizada diluída a 1:50 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) a 1:100. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05%, em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40vv, a 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos obtidos de lesões ricas em *Giardia*. Como controle negativo, o antisoro 1° foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, concentrada por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan.

Após a reação, toda a superfície mucosa da porção proximal do intestino delgado foi visualizada por meio da objetiva de 10X e digitalizada por meio da mesma microcâmara. Todos os pixels com tons de marrom dos trofozoítos marcados pela imunohistoquímica foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área total de marcação. Processamento digital e recursos do software KS400 foram utilizados para eliminar artefatos.

#### **4.17 Destinação das carcaças**

Após a eutanásia, as carcaças foram imediatamente acondicionadas em sacos de lixo branco, identificados como lixo biológico infectante e refrigerados a -20°C, no freezer do Departamento de Parasitologia (ICB-UFMG), que é exclusivamente utilizado para o armazenamento temporário dessas carcaças.

Posteriormente, essas estruturas foram coletadas como lixo biológico infectante pelo serviço de limpeza do ICB, direcionados para o abrigo externo específico e recolhidos pelo Serviço de Limpeza Urbana (SLU) para posterior inceneração.

## **5. RESULTADOS / DISCUSSÃO**

A giardíase é a infecção parasitária de mais ampla distribuição no mundo desenvolvido, contribuindo para pelo menos 280 milhões de casos sintomáticos anuais. Contudo, nos países em desenvolvimento a prevalência alcança índices que variam, principalmente, de acordo com as condições sanitárias da região (Morrison *et al.* 2007).

A *Giardia* vive no intestino delgado em condições adversas à sua colonização. Os enterócitos são renovados periodicamente. O trânsito intestinal e a resposta imune são desfavoráveis à sua adesão. Apesar disso, a *Giardia* coloniza o intestino originando quadros clínicos como diarreia e má-absorção intestinal. Sua sobrevivência no ambiente inóspito intestinal parece estar relacionada à variação antigênica e encistamento. A variação antigênica confere ao parasito uma alternância de antígenos de superfície específicos entre 6-13 gerações. Desta forma o parasito escapa da resposta imune do hospedeiro. O encistamento é o processo pelo qual é formada a parede cística que promove a resistência do parasito às alterações ambientais (Ankarklev *et al.*, 2010).

A colonização do intestino pela *Giardia* gera alterações locais e sistêmicas. A infecção é autolimitada em indivíduos competentes imunologicamente e nutricionalmente. Parece que a infecção crônica, gerando a síndrome disabsortiva, se relaciona a déficits imunológicos e nutricionais. Nesse caso, crianças são os principais alvos e as consequências se revelam em déficit no seu desenvolvimento físico e cognitivo. Os mecanismos envolvidos na patogênese da giardíase são pouco conhecidos e muitas alterações denunciadas são controversas. Questões simples como o perfil bioquímico, hematológico e imunológico na giardíase não são conhecidos. Muito menos é sabido da história natural da doença, desde a infecção até a cura parasitológica.

Uma abordagem interessante para melhor estudar os fatores intrínsecos de uma doença é a utilização de modelos experimentais. Dentre os modelos usados para estudar giardíase estão os gerbils, que são considerados bons modelos por reproduzirem satisfatoriamente a giardíase humana (Araújo *et al.*, 2008). Diante do exposto, foi estudada a progressão da giardíase em gerbils experimentalmente infectados enfatizando as alterações no perfil bioquímico, hematológico e imunológico decorrente da enfermidade.

Devido ao grande número de analitos dosados, os animais foram estudados em três diferentes ocasiões, que serão apresentadas a seguir.

## 5.1 Perfil da infecção

Para iniciar a infecção experimental nos gerbils, todos os animais tiveram as fezes coletadas e processadas para exame microscópico e ELISA para determinação de coproantígenos de *G. lamblia*. Todos foram negativos em ambos os exames.

Após a infecção com *G. lamblia*, as fezes dos animais foram coletadas a cada dois dias para exame em microscópio ótico e avaliação de coproantígenos pelo método de ELISA.

A coleta de dados foi dividida em três fases, com diferentes grupos de animais.

Avaliando-se os animais nas três fases de coleta de dados, os coproantígenos positivaram a partir do quarto dia da infecção e começaram a negativar a partir do 21º dia. A maioria dos animais ficou negativa no 23º dia da infecção. Um único animal negatizou o coproantígeno no 46º dia da infecção. Progressivamente, os títulos da reação foram diminuindo até negativarem.

No exame parasitológico de fezes, a maioria dos animais apresentou cistos de *Giardia* nas fezes que permaneceram positivos até o 32º dia da infecção, com carga parasitária também progressivamente menor, havendo identificação de cistos no material analisado. No 35º dia da infecção, não foram mais observados cistos nas fezes dos animais.

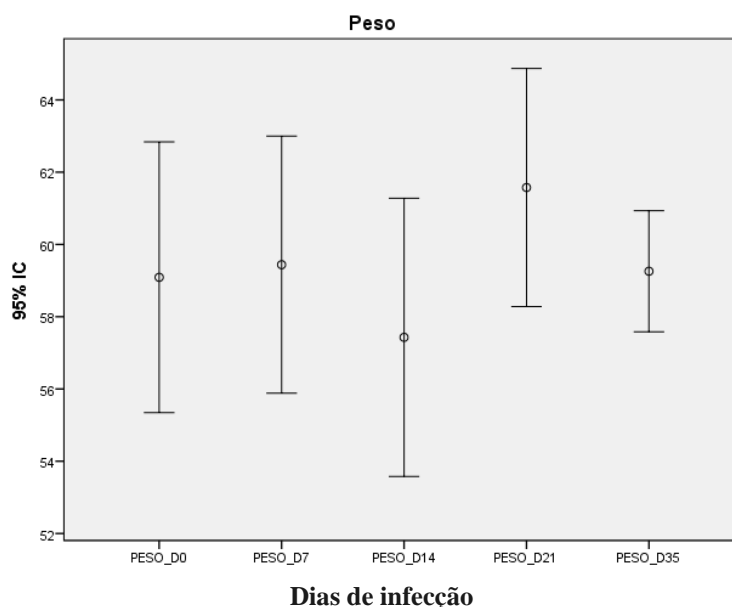


Figura 4 – Progressão da giardiase em gerbils infectados experimentalmente. Média de peso antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).



Não foram observadas alterações na consistência das fezes, nem no peso dos animais (Figura 4), ao longo do experimento, sugerindo que a cepa utilizada tenha produzido infecção assintomática nos animais.

## 5.2 Perfil bioquímico – 1ª fase

Avaliaram-se amostras de sangue: dois grupos de animais, oito machos e oito fêmeas.

Apresentaremos abaixo a avaliação geral dos 16 animais, sem separá-los por grupo.

D0= Grupo controle, antes da infecção.

Grupos no tempo (dias): d7, d14, d21, d28, d35, d42, d49, d63.

### 5.2.1 Avaliação global

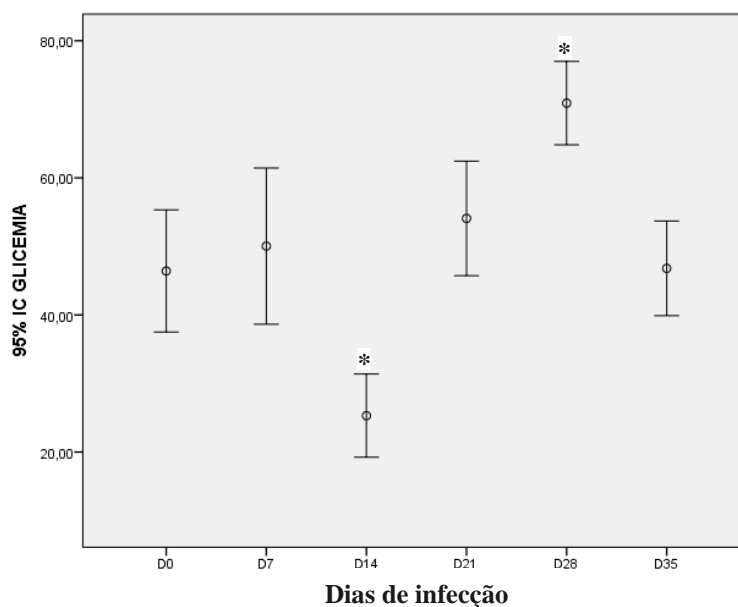


Figura 5 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da glicemia antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

A glicemia foi significativamente menor no D14, comparado ao controle e aos demais períodos ( $p < 0,001$ ), começando a aumentar no D21 com pico no D28, em relação ao controle e aos demais grupos ( $p < 0,001$ ) (Figura 5).

É sabido que a glicemia tende a aumentar em processos inflamatórios, infecciosos ou

não (Collier *et al.*, 2008). Isso ocorre principalmente devido ao aumento da resistência insulínica, induzindo uma série de alterações vasculares, imunológicas e metabólicas (Wilcox, 2005). Sendo assim, os níveis glicêmicos que tiveram um crescimento significativo a partir da 3ª semana de infecção e retorno a valores basais após a cura espontânea, sugerem que a giardíase seja responsável por um processo inflamatório a partir da 3ª semana de infecção. Essas inferências são corroboradas pelas medições da insulina.

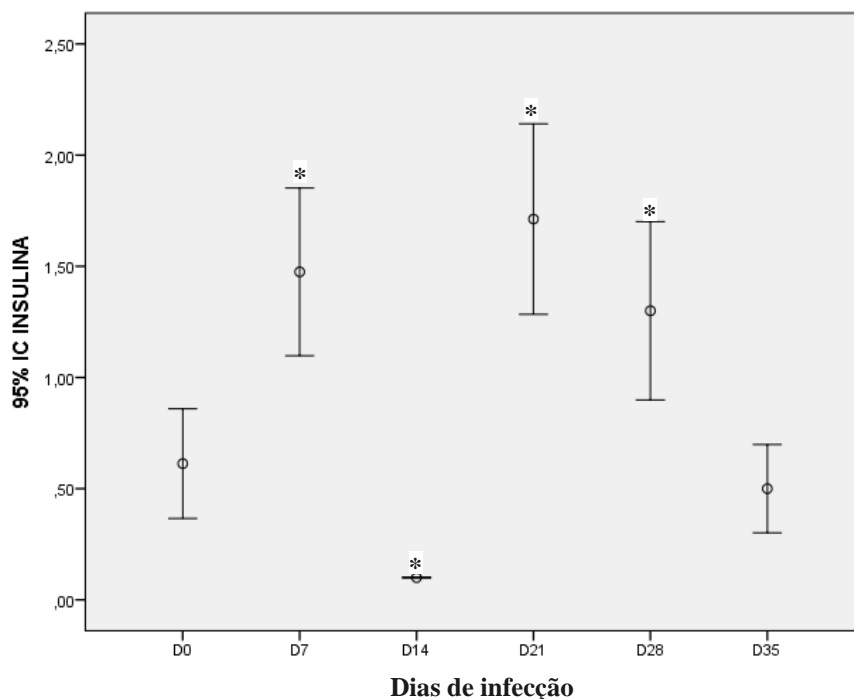


Figura 6 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da insulina antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Há uma elevação significativa da insulina no D7, seguida de uma queda significativa no D14, voltando a se elevar no D21 e D28, de modo significativo, progredindo com redução significativa até o D35, quando retorna ao valor similar ao controle (Figura 6).

Provavelmente, a infecção desencadeou inflamação suficiente para gerar aumento da resistência insulínica periférica, com estímulo para a sua secreção pelo pâncreas. Como houve cura, provavelmente houve melhora do processo inflamatório e nova redução da insulinemia a valores basais.

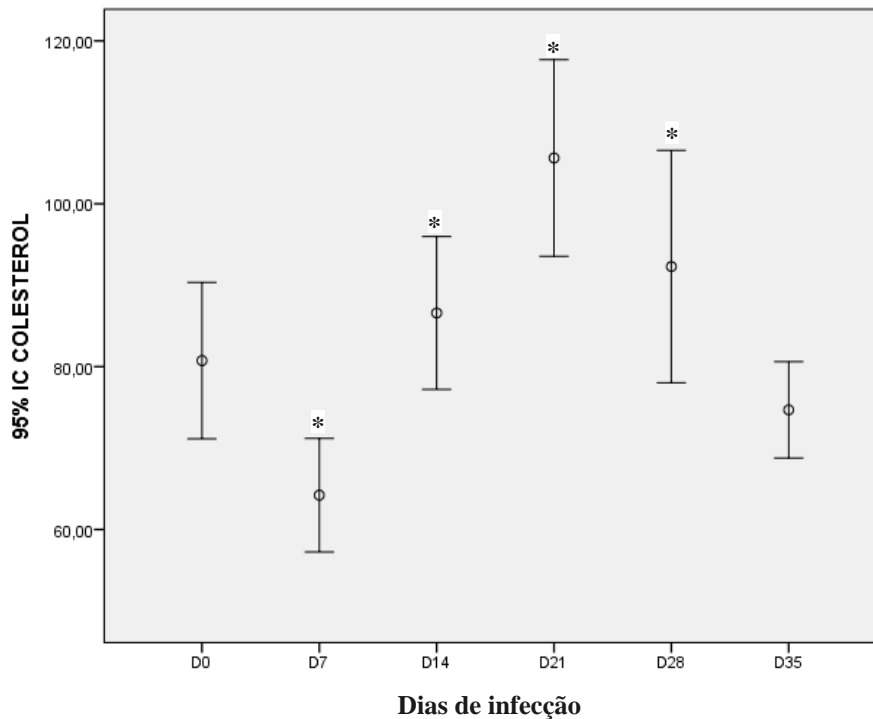


Figura 7 – Progressão da giardiase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do colesterol antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Quanto ao colesterol, observamos uma redução significativa no D7, com elevação, também significativa, nos períodos seguintes, retornando ao valor semelhante ao D0, no D35.

Em estudos anteriores do nosso grupo, inferiu-se que em infecções assintomáticas pela *Giardia* há aumento da ingestão de alimentos (Ventura, dados não publicados). Embora não tenha havido alteração significativa do peso dos animais durante o curso da infecção (Figura 4), acredita-se que houve aumento da ingestão alimentar e que isso tenha contribuído para o aumento dos índices de colesterol a partir da segunda semana de infecção, com seu pico no D21, coincidindo com o ápice infeccioso sugerido pelas leituras da glicemia e insulina.

A relação da *Giardia* com a concentração de colesterol é fundamental para estabelecimento dos estágios evolutivos, desenvolvimento e estabelecimento do parasito (Bansal *et al.*, 2005a).

Como um “parasito de mucosa”, sem mitocôndrias, complexos de Golgi bem desenvolvidos, e outras organelas típicas de eucariotas superiores (Beaver, 1984), a *Giardia* desenvolve vias metabólicas únicas que lhe permite sobreviver e se multiplicar capturando nutrientes do hospedeiro, mas são incapazes de sintetizar a maioria dos seu próprios lipídios e

colesterol (Das, 2002).

Por ser um parasito incapaz de sintetizar o colesterol (Jarrol *et al.*, 1981), ela o obtém a partir do intestino delgado superior, que é rico em bile e colesterol proveniente da dieta (Field *et al.*, 1990; Thomson *et al.*, 1993). Como a biogênese de membrana em *Giardia* requer colesterol (Jarrol *et al.*, 1981; Kaneda e Goutsu, 1985), parece óbvio que uma maior concentração de colesterol beneficie o desenvolvimento e reprodução do parasito, potencializando a infecção.

Todos os parasitos metabolizam o colesterol, mas a relação exata com o mecanismo patogênico não é clara. O colesterol presente na membrana dos protozoários parasitos em geral é determinante para que invadam as células do hospedeiro (Simons e Toomre, 2000). Embora não seja o caso, pois, até que estudos mais conclusivos apontem em direção contrária, a *Giardia* não invade os tecidos do hospedeiro, a concentração do colesterol na luz intestinal do hospedeiro parece ser determinante para a sobrevivência do parasito. O encistamento dos trofozoítos pode ser induzido, *in vitro*, por redução da concentração de colesterol (Gillin *et al.*, 1996; Luján *et al.*, 1997).

Estudos recentes têm demonstrado níveis elevados de lipoproteínas, como as de alta densidade (HDL), as de baixa densidade (LDL) e o colesterol total nos doentes que sofrem de infecções parasitárias (Faucher *et al.*, 2002).

Todavia, em direção oposta, Bansal *et al.* (2005b) observaram que pacientes infectados com *G. lamblia* apresentaram menores níveis de parâmetros lipídicos (colesterol total, HDL e LDL), em comparação ao grupo controle saudável.

Onongbu e Onyeneke (1983) relataram que há alterações significativas na concentração de colesterol do plasma, durante e após a infecção por malária. Contudo, baixos níveis de colesterol em pacientes com malária, em comparação com controles saudáveis normais, também foram relatados (Djoumessi, 1989).

No caso da *Entamoeba histolytica*, o aumento do colesterol está diretamente relacionado com o desenvolvimento do parasito e estabelecimento da amebíase (Sharma 1959; Gargouri 1967). O mesmo acontece com a infecção por *Trichomonas* (Linstead, 1981), *Toxoplasma gondii* (Sonda *et al.*, 2001), entre outros.

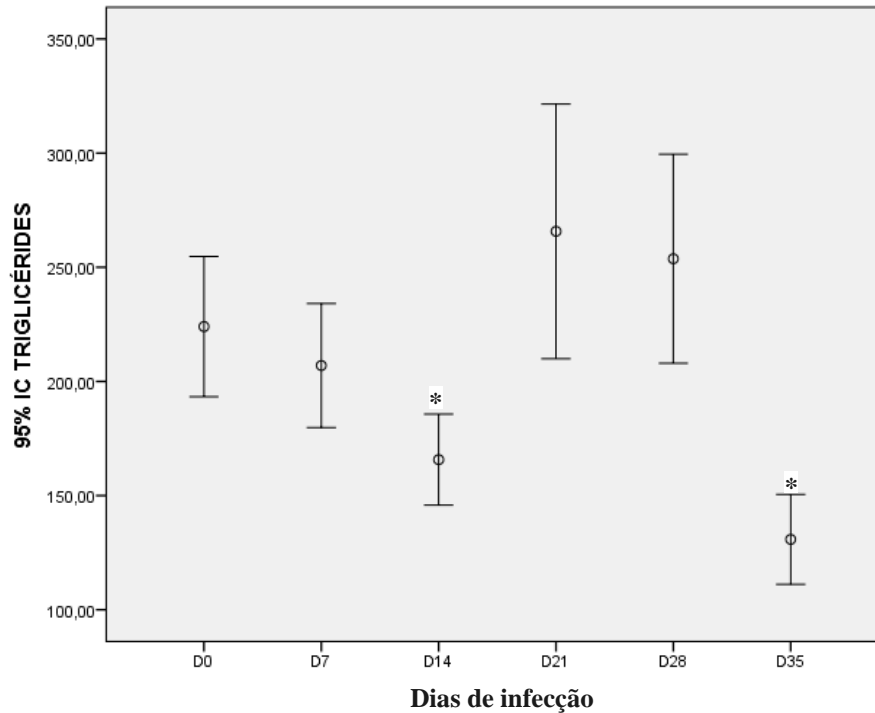


Figura 8 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do triglicérides antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Os valores de triglicérides também apresentaram um comportamento similar ao do colesterol, mas menos evidente e ocorrendo mais lentamente, com redução significativa do seu valor até o D14 em relação ao controle, elevando-se no D21 e D28 para valores similares ao D0, mas significativo em relação ao D14, com uma última redução significativa em relação a todos os valores anteriores, no D35 (Figura 8).

A elevação significativa dos triglicérides na terceira semana reforça os achados anteriores ao analisarmos os resultados da glicemia e insulina, apontando para um estado inflamatório gerado pela giardíase a partir da segunda semana de infecção.

Estudo com outras infecções como na malária aguda, a avaliação das alterações das lipoproteínas plasmáticas, resultaram em diminuição dos níveis de HDL e LDL e moderado aumento do triglicérides (Nilson e Nilson, 1990). No entanto, em estudo sobre a ascariíase observou-se diminuição dos níveis de colesterol total, HDL e triglicérides (Biadun, 1990).

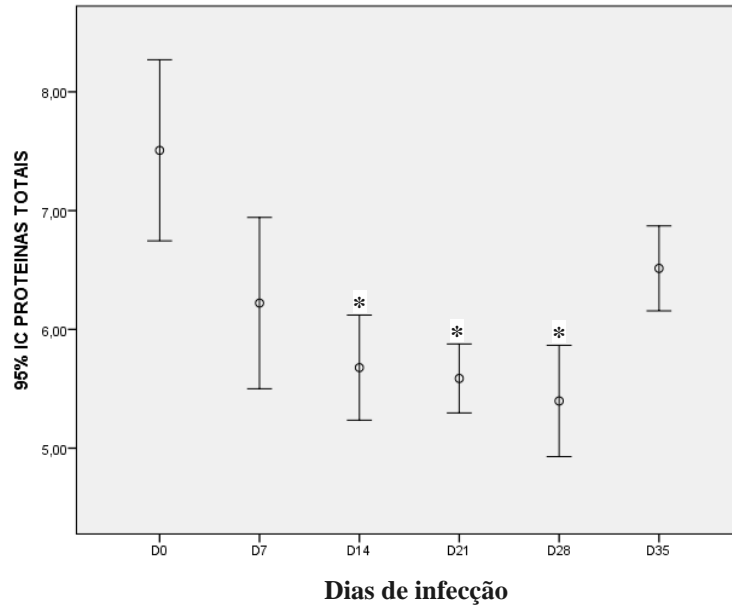


Figura 9 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da proteína total antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Nota-se nítida curva de tendência significativa à queda do valor sérico das proteínas totais, do D0 para o D7, e deste ao D14 ( $p < 0,001$ ), quando se mantém mais baixa do D14 ao D28, retornando a valores mais elevados no D35 (Figura 9), apesar da elevação da albumina (Figura 10).

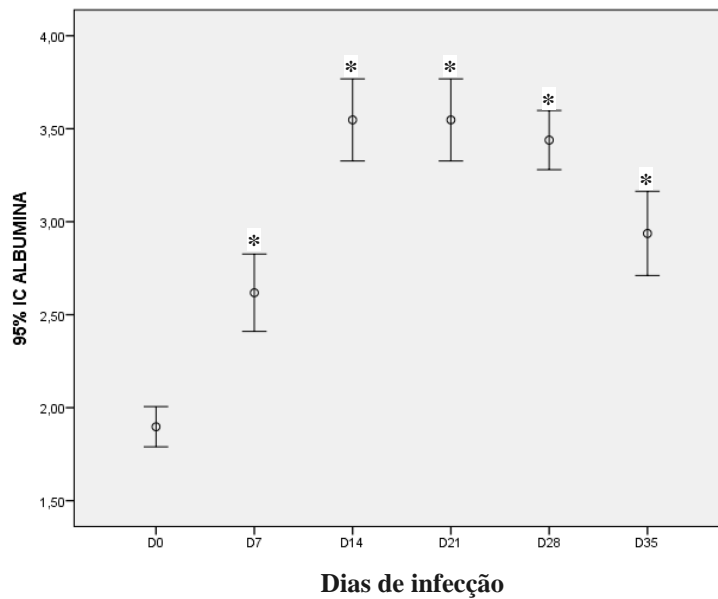


Figura 10 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da albumina antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

A albumina<sup>18</sup> apresentou um padrão de comportamento interessante; eleva-se significativamente a partir da primeira semana após a infecção, atinge um platô que fica estável até o D28, voltando a cair no D35, permanecendo significativamente mais elevada do que o controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 10).

O que se esperava era que a resposta inflamatória à giardíase gerasse um estado de hipercatabolismo protéico com elevação dos níveis séricos das proteínas totais, estreitamente atrelado à elevação da produção de imunoglobulinas. Mas o observado foi uma queda das proteínas totais durante o curso da infecção, apesar da elevação da albumina. Essa elevação pode ter sido causada por um estado de anabolismo e pela alteração no padrão de ingestão alimentar sem, entretanto, superar o catabolismo dos outros componentes protéicos no sangue, já que o peso dos animais não variou significativamente (Figura 4).

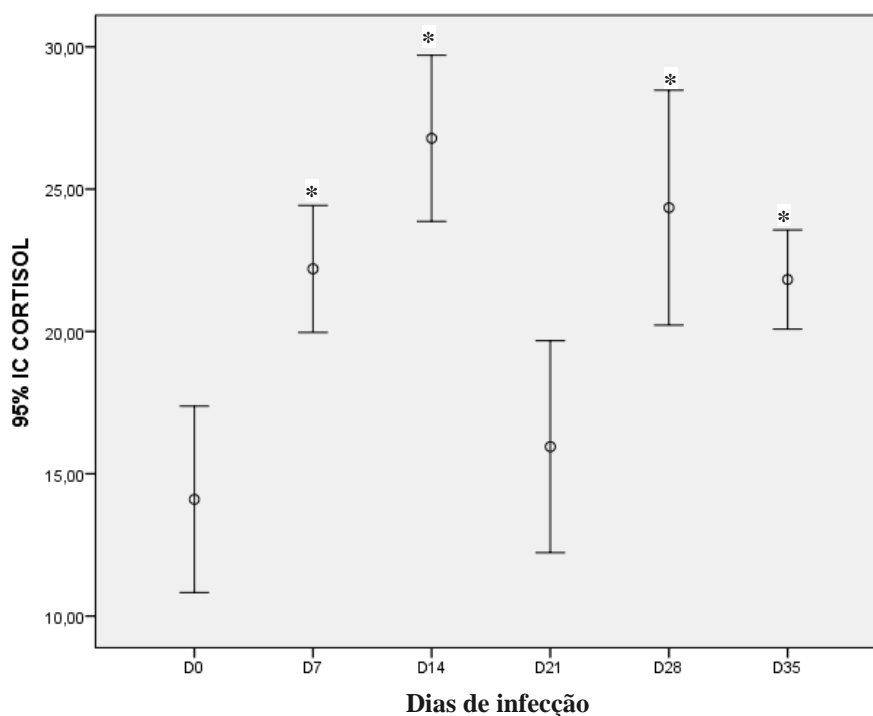


Figura 11 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do cortisol antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

<sup>18</sup> A principal função da albumina é o transporte e armazenagem de uma ampla variedade de substâncias de baixo peso molecular, como o cortisol, hormônios sexuais, cálcio e várias drogas.

O cortisol, um anti-inflamatório potente que estimula a quebra de proteínas e paralisa o anabolismo, apresentou um comportamento esperado, ou seja, uma elevação significativa após o D7 de infecção até o D14, quando, provavelmente, os animais encontravam-se inflamados ainda com a infecção ativa pela *Giardia*; a seguir, volta a cair, mas para valores ainda significativamente maiores que o controle (sem uma explicação que possa justificar, uma vez que estaria na fase de cura espontânea). Esta elevação persistente do cortisol poderia explicar o catabolismo dos animais, associado ao aumento do apetite e ingestão alimentar, explicando a elevação da albumina. Há uma redução no D21 que, novamente, pode ser relacionada a alterações orquestradas pela *Giardia* na terceira semana de infecção.

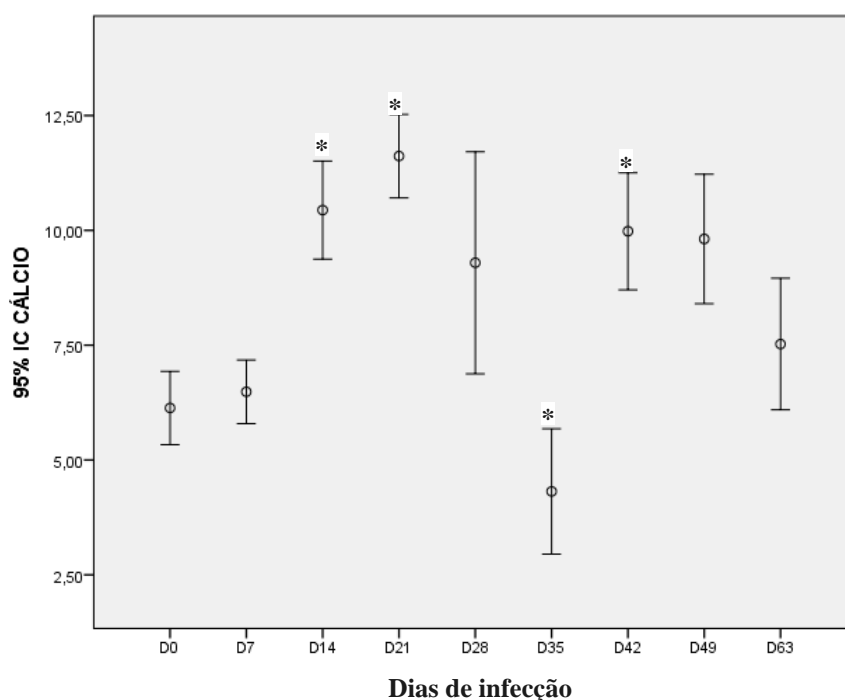


Figura 12 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do cálcio antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias).  
\* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

O comportamento dos níveis séricos de cálcio oscilou durante o período do experimento, porém a partir do D14 tornou-se significativamente mais elevado, perdurando desse modo até o D63 (embora tenha havido uma queda significativa em D35), porém sem uma explicação razoável, já que o controle desse íon é realizado de modo eficiente pela calcitonina e pelo paratormônio. Geralmente, somente alterações mais profundas do ponto de vista desses hormônios levariam a oscilações significativas e reais do mesmo. Entretanto,



como há uma elevação significativa da albumina sérica, esta pode ter influenciado na mensuração do valor do cálcio total, pois o mesmo se associa à albumina para transporte e armazenamento (Figura 12).

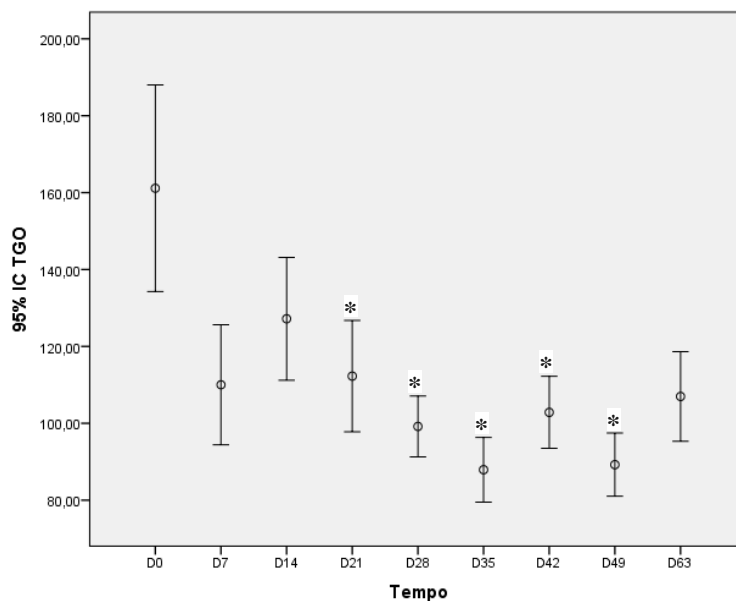


Figura 13 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do TGO(AST) antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Não obstante a *Giardia* não invadir tecidos nem atingir o fígado, e de trofozoítos serem encontrados nos ductos colédocos<sup>19</sup> e na vesícula biliar, nosso grupo identificou esteatose hepática nos animais infectados com *Giardia* (Ventura, 2013). Assim, procurou-se avaliar algumas enzimas hepáticas (TGO/AST, TGP/ALT e fosfatase alcalina) tentando estabelecer um padrão na giardíase.

A TGO (AST) apresentou redução significativa ao longo do tempo, mantendo-se no D63 em valores significativamente menores do que o controle, apesar da cura da giardíase. A TGO é uma enzima que se encontra nas células dos músculos, coração e fígado. Seu aumento pode diagnosticar processo patológico, em uma destas células. Sua diminuição não está associada a patologias importantes. Acredita-se então que a diminuição aqui observada não se associe à giardíase.

<sup>19</sup> O ducto colédoco (antigamente chamado de ducto biliar comum) é uma parte terminal das vias biliares, formado entre o canal cístico vindo da vesícula biliar e do ducto hepático comum vindo das vias biliares intra-hepáticas. Permitindo a excreção da bile, ele despeja o seu conteúdo no intestino na altura do duodeno.

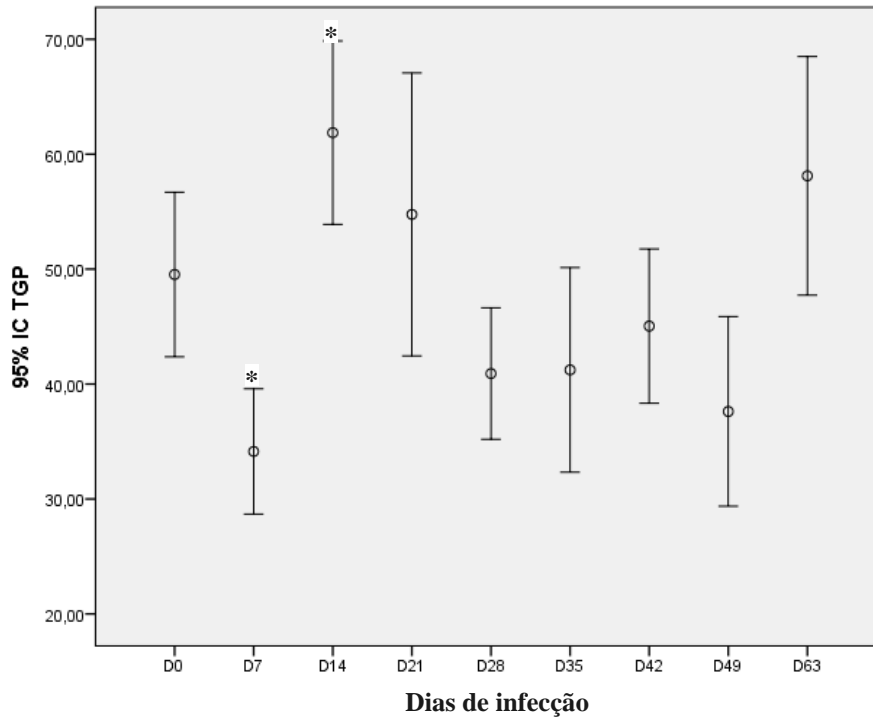


Figura 14 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do TGP(ALT) antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

A TGP (ALT) apresentou queda significativa na primeira semana (D0 x D7 –  $p < 0,05$ ), elevando-se significativamente no D14 e D21 em relação tanto ao D0 como ao D7. A partir do D28 reduziu-se significativamente, em relação ao D21 e D14, mas não em relação ao D0, ou seja, retornou a valores similares ao controle. Porém, no D63 ela retornou a valores mais elevados, significativamente, em relação aos períodos de platô inferior (D28, D35, D49), mas não ao controle.

A elevação da TGP (ALT), enzima encontrada quase que exclusivamente em células hepáticas, relaciona-se à lesão nestas células quando o aumento é três vezes maior que o basal. O aumento encontrado foi pequeno, sendo considerado inespecífico, podendo relacionar-se a lesões em outros órgãos.

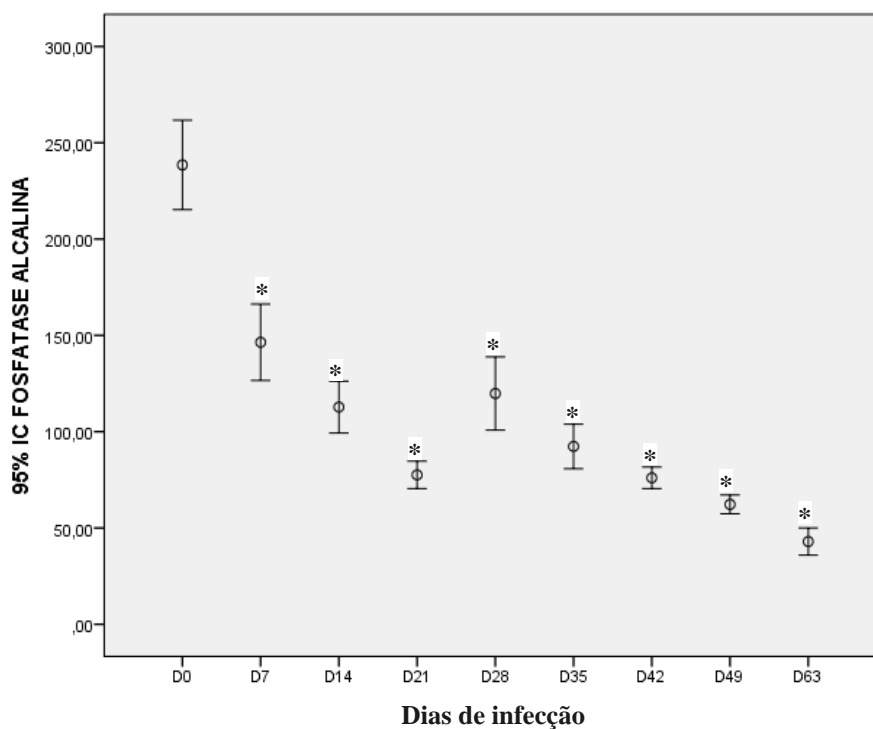


Figura 15 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da fosfatase alcalina antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias, D42=42 dias, D49=49 dias, D63=63 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

A fosfatase alcalina é uma das enzimas presentes nas células das vias biliares, podendo ser encontrada em grande quantidade em vários outros órgãos, principalmente nos ossos, placenta e intestinos e, analogamente à TGO e TGP, a lesão dessas células causa uma elevação dos seus níveis no sangue (Coleman, 1992; Huang *et al.*, 2006).

Os níveis de fosfatase alcalina apresentaram queda significativa e progressiva a cada período medido, exceto no D21 e D28, quando novamente se elevam, mas significativamente menos do que o controle, voltando à redução progressiva e significativa, nos períodos seguintes, ao longo do tempo, sem retornar aos valores iniciais. Esses resultados somam-se aos da TGO e TGP, sugerindo que as funções hepáticas não seriam alteradas pela infecção (Figura 15).

Os resultados dessas três enzimas sugerem que, não obstante a proximidade dos trofozoítos, nem as funções hepáticas, nem os hepatócitos seriam alterados pela infecção e que o quadro de esteatose hepática observado, se causado pela giardíase, tenha outro mecanismo gerador.

Tabela 3 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da proteína C reativa antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

mg/dl	Média	DP*
PCR_D0	0,10	0,00
PCR_D7	0,10	0,00
PCR_D14	0,10	0,00
PCR_D21	0,10	0,00
PCR_D28	0,14	0,01
PCR_D35	0,11	0,01

A proteína C reativa (PCR) não foi detectável no soro dos animais (BIOLATEX PCR - Bioclin), mesmo usando métodos ultrasensíveis como a “proteína C reativa altamente sensível (PCR-as)” ou “proteína C reativa ultrasensível (PCR-us)”, o que permitiria detectar com segurança valores de PCR tão baixos quanto 0,03 mg/dL (0,3 mg/L).

Esta proteína plasmática é produzida pelo fígado. Sua função fisiológica é ligar-se à fosfocolina expressa na superfície de células mortas ou lesionadas (e alguns tipos de bactérias), para iniciar sua eliminação ao ativar o sistema complemento e células que fazem fagocitose, funcionando como uma opsonina. É indicador extremamente sensível de inflamação (Epstein *et al.*, 1999). Sua concentração é baixa em indivíduos saudáveis, porém na presença de infecções ou respondendo a estímulos inflamatórios pode aumentar em até 1.000 vezes (Clyne e Olshaker 1999). Tem sido demonstrada elevação dos níveis da PCR em infecções diarreicas por *G. lamblia* em humanos (Al-Ezzy *et al.*, 2015). No presente estudo, os níveis não detectáveis dessa proteína talvez se correlacionem com a cepa (Portland-1), uma vez que tenha produzido infecção assintomática nos animais.

### 5.2.2 Avaliação das variáveis conforme o sexo

Machos e fêmeas apresentaram diferenças em alguns parâmetros analisados. Assim, realizou-se uma análise somente para o grupo de machos para avaliar se os resultados desse grupo impactariam no resultado geral do grupo todo. Os machos foram escolhidos devido à menor variação hormonal. Em anexo são apresentadas essas análises (Anexo 4).

Apesar das diferenças em algumas variáveis entre machos e fêmeas, o comportamento do grupo dos machos, individualmente, foi similar ao comportamento dos grupos juntos, valendo, assim, o mesmo arrazoado descrito anteriormente.

### 5.3 Perfil hematológico – 2ª fase

Até agora, raros são os relatos sobre alterações hematológicas induzidas pela infecção por *Giardia* (Naik *et al.*, 1982; Cheeramakara *et al.*, 2004; Monajemzadeh e Monajemzadeh, 2008). Inexistentes são os estudos que avaliam o perfil hematológico completo, desde a infecção até a cura espontânea. Visando diminuir o tamanho desta lacuna, foram monitorados os parâmetros hematológicos e imunológicos de gerbils durante a infecção por *G. lamblia*.

Nesta segunda fase de coleta de dados, avaliaram-se amostras de sangue de 38 animais machos.

Apresenta-se abaixo a avaliação global dos animais, quanto aos aspectos hematológicos e imunológicos.

D0= Grupo controle, antes da infecção.

Grupos no tempo (dias): d7, d14, d21, d28, d35.

#### 5.3.1 Avaliação global

A análise da série vermelha no hemograma contempla a quantificação de eritrócitos, hematócrito, dosagem de hemoglobina e índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM, RDW), bem como o exame microscópico da morfologia eritrocitária. Esses dois conjuntos de análises fornecem subsídios para o diagnóstico das principais causas de anemias.

Abaixo apresentam-se os valores da contagem das hemácias ao longo da infecção.

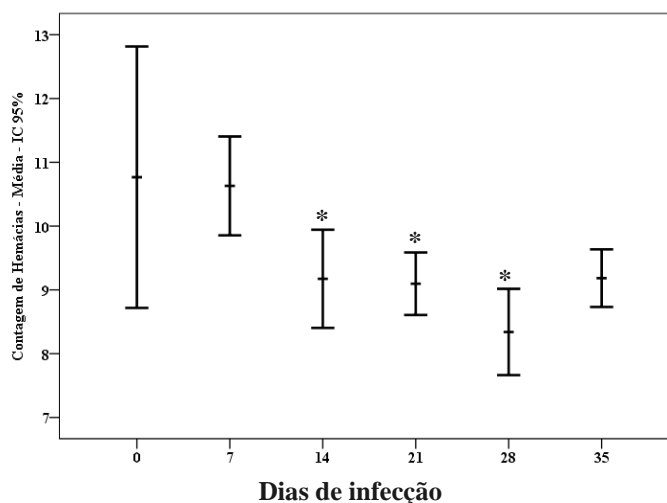


Figura 16 – Progressão da giardíase em gerbils infectados experimentalmente. Média das hemácias antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Observou-se uma queda progressiva e significativa do número de hemácias, com a maior queda a partir do D14, em relação ao controle e à 1ª semana ( $p=0,021$  e  $p=0,035$  respectivamente). Esta queda se manteve até o D28, de modo progressivamente significativo em relação ao D0 e D7. A anemia teve início a partir da segunda semana de infecção continuando a queda até o D28. No D35 começou a se elevar.

Variações semelhantes puderam ser observadas para os níveis de hemoglobina e hematócrito. Houve uma queda progressiva e significativa da hemoglobina, com a maior queda a partir do D14, em relação ao controle e o D7 ( $p=0,029$  e  $p=0,038$  respectivamente). Esta queda se manteve até o D28, de modo progressivamente significativo em relação ao D0 e D7. No D35 a hemoglobina também começou a se elevar. Foi observada queda progressiva e significativa do hematócrito a partir do D14, em relação ao controle e o D7 ( $p=0,016$  e  $p=0,019$  respectivamente). Esta queda se manteve até o D28, de modo progressivamente significativo em relação ao D0.

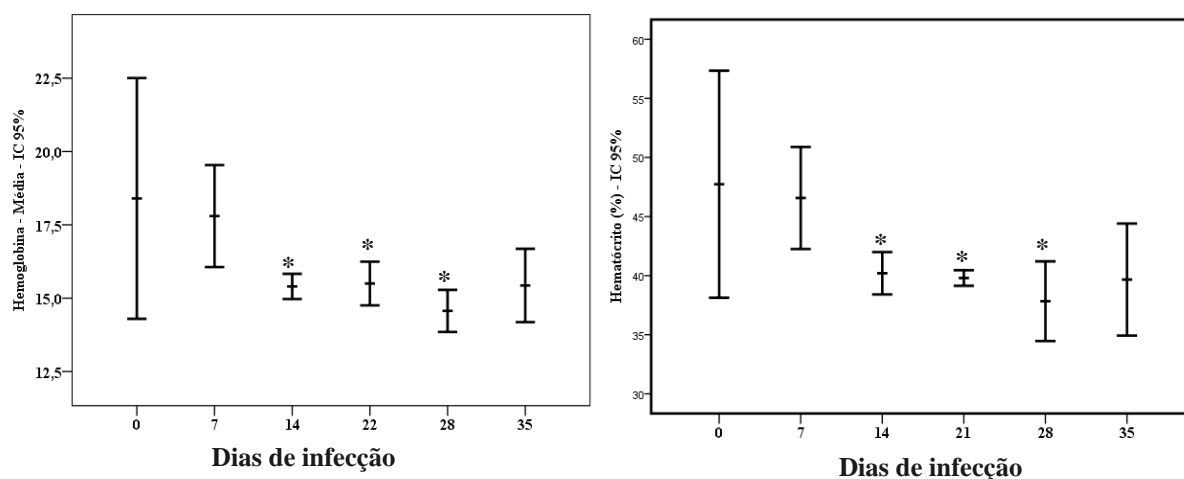


Figura 17 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da hemoglobina e hematócrito antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Os animais infectados mostraram redução significativa no número de hemácias, na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito, a partir da segunda semana de infecção, confirmando uma anemia relacionada à giardíase. Redução na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito foi também observado em ratos experimentalmente infectados com *Giardia* em outro estudo (Cheeramakara *et al.*, 2004). Estes resultados estão em concordância com relatos prévios (Naik *et al*, 1982; De Vizia *et al*, 1985) avaliando

pacientes com giardíase.

Em quadros de infecções agudas ou crônicas em geral, pode haver queda do número de hemácias (anemia), por síndromes de má absorção do ferro, por redução da ingestão de ferro alimentar, por destruição das hemácias e perda do ferro via hemoglobinúria, ou por perdas sanguíneas gastrointestinais, urinárias ou por lesões cutâneas ou de órgãos internos. Além disso, o processo inflamatório pode levar à depressão da hematopoiese por diversas vias.

Interessante notar que apesar da cura espontânea da infecção (negativação parasitológica e sorológica), a anemia se manteve, talvez porque a anemia seja prioritariamente ferropriva secundária à giardíase que somente se resolveria após reposição de ferro (Gheorghescu *et al.*, 1976; De Vizia *et al.*, 1985; Olivares *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2005; Monajemzadeh e Monajemzadeh, 2008).

Os valores do ferro sérico não sofreram alteração significativa durante a infecção. Apesar disso, foi observada diminuição dos valores a partir da segunda semana de infecção. Assim, será que é possível relacionar a anemia à diminuição do ferro sérico (Figura 18)?

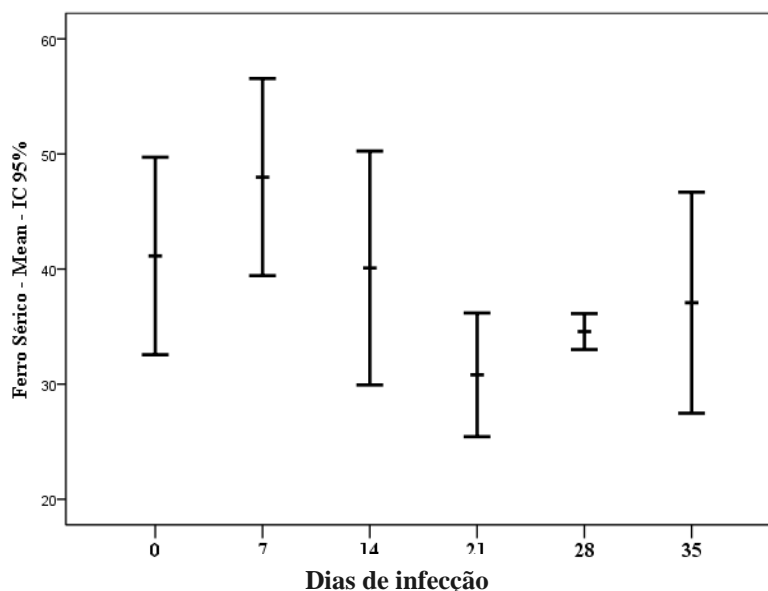


Figura 18 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do ferro sérico antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Com as alterações metabólicas pro-hipercatabolismo observadas, com estímulo ao aumento da produção pelo fígado da hepcidina, hormônio regulador do metabolismo de ferro,

a anemia poderia não se caracterizar pela deficiência na ingestão do mineral, mas sim pelo seu catabolismo, induzido pela ativação sistêmica da inflamação.

Corroborando para explicar a anemia ferropriva, estão os valores de RDW que sofreram elevação a partir do D7 (Figura 19).

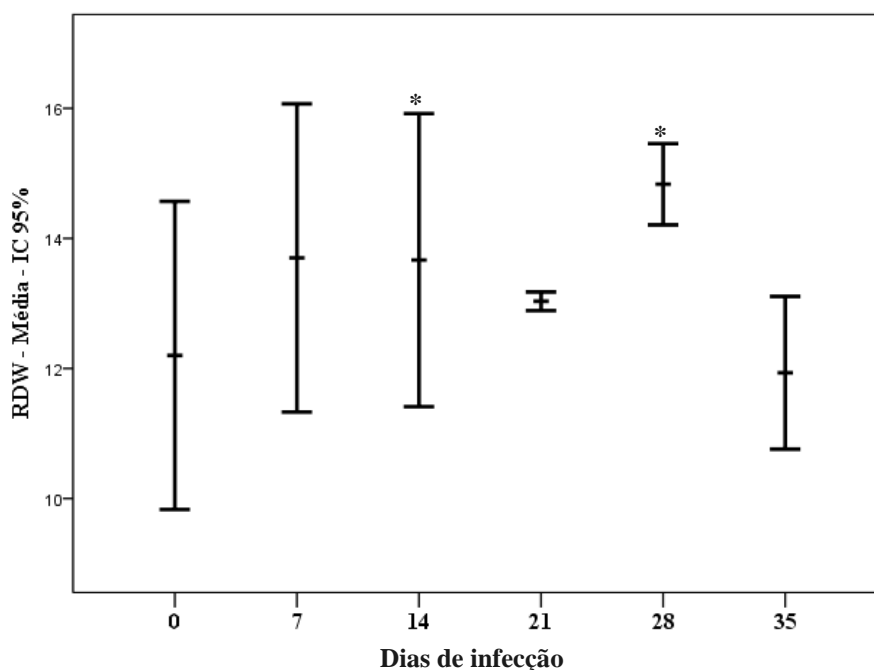


Figura 19 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do RDW antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

RDW é um índice que avalia a diferença de tamanho entre as hemácias. Quando esse está elevado, acima do padrão, significa que existem muitas hemácias de tamanhos diferentes circulando (anisocitose). Isso pode indicar hemácias com problemas na sua morfologia. É muito comum RDW elevado, por exemplo, na carência de ferro, onde a falta deste elemento impede a formação da hemoglobina normal, levando à formação de uma hemácia de tamanho reduzido (microcitose). Esse índice permite diferenciar a anemia ferropriva da talassemia<sup>20</sup>, já que a talassemia apresenta um valor normal de RDW, enquanto esse valor é alterado no caso da anemia ferropriva.

<sup>20</sup> Talassemia é uma doença hereditária autossômica recessiva caracterizada por redução da taxa de síntese de uma das cadeias de globina que formam a hemoglobina resultando em sintomas de anemia devido à má formação de moléculas de hemoglobina. A talassemia é um problema quantitativo de globinas pouco sintetizadas, enquanto que a anemia falciforme é um problema qualitativo na síntese e de um funcionamento incorreto da globina (Weatherall, 2010).



Em análise ao MO, não foi observada alterações na morfologia das hemácias dos animais nos diferentes tempos do experimento, colocando em cheque a participação do ferro na anemia.

Outro fator que desmistifica a deficiência de absorção do ferro na giardíase como causa de anemia é o fato de que somente pequena proporção de ferro sérico vem da dieta (Armah *et al.*, 2013). A vitamina B12 também pode se relacionar à anemia. Em giardíase, os poucos relatos de anemia por deficiência de vitamina B12 se associam a infecções sintomáticas (Cordingley e Crawford 1986). Não foi medida a vitamina B12, pois não foi obtida amostra de sangue suficiente. Com os dados do presente estudo, acredita-se que a cepa (Portland-1) usada em nosso modelo produziu infecção assintomática nos animais, não sendo observada alteração significativa de peso ou da consistência das fezes nos gerbils ensaiados.

A ferritina, importante proteína de reserva do ferro, encontrada em todas as células, especialmente naquelas envolvidas na síntese de compostos férricos, no metabolismo e na reserva do ferro, em condições normais, pode representar 25% do ferro total encontrado no corpo. Apesar de ser um importante parâmetro para se avaliar a quantidade de ferro no organismo, não foi possível dosá-la, pois não existem *kits* no mercado compatíveis com gerbils que pudessem ser utilizados.

Assim, acredita-se que o processo inflamatório produzido pode ter induzido essas alterações hematológicas. Contudo, o mecanismo gerador da anemia precisa ser melhor elucidado.

Outros parâmetros como VCM, HCM, CHCM e plaquetas não apresentaram alterações significativas. Os valores basais destes parâmetros e os obtidos no curso da infecção são apresentados na tabela 4.

Como mencionado acima, não houve alterações significativas dos valores das plaquetas, ao longo do tempo do experimento. Em concordância com esses achados, Kralisz e Matowicka-Karna (2008) não observaram alteração significativa nas plaquetas na infecção em humanos. Apesar disso, os autores referem que observaram um ligeiro aumento no volume plaquetário médio (VPM), também não significativo, sugerindo que a infecção pela *Giardia* muda a quantidade e os parâmetros morfológicos das plaquetas do sangue e pode ser um indicador de ativação plaquetária.

Resumindo os achados hematimétricos do presente estudo, observou-se que os animais infectados mostraram redução significativa no número de hemácias, na concentração de

hemoglobina e no valor do hematócrito, a partir da segunda semana de infecção, confirmando uma anemia relacionada à giardíase. Redução na concentração de hemoglobina e no valor do hematócrito foi também observado em ratos experimentalmente infectados com *Giardia* em outro estudo (Cheeramakara *et al.*, 2004). Esses resultados estão em concordância com relatos prévios (Naik *et al.*, 1982; De Vizia *et al.*, 1985) que avaliaram pacientes com giardíase.

Tabela 4 - Valores hematológicos antes e depois da infecção de gerbils por *G. lamblia*.

Variáveis Hematológicas	Progressão da infecção por <i>G. lamblia</i> (dias pós-infecção – DPI)					
	Basal	7 DPI	14 DPI	21 DPI	28 DPI	35 DPI
<b>RBC</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	10.48 ± 0.39	10.63 ± 0.18	9,38 ± 0,190	8.89 ± 0.15	8.68 ± 0.23	8.92 ± 0.28
<b>Hb</b> (g/dL)	17.82 ± 0.73	17.8 ± 0.40	15,62 ± 0.17	15.32 ± 0.15	15.04 ± 0.32	15.63 ± 0.37
<b>Hct</b> (%)	46.12 ± 1.80	46.57 ± 1.00	40.84 ± 0.54	39.28 ± 0.34	37.8 ± 0.91	38.55 ± 1.36
<b>VCM</b> (fL)	44.02 ± 0.26	43.81 ± 0.75	43.88 ± 0.41	44.19 ± 0.41	45.08 ± 0.45	43.22 ± 0.56
<b>HCM</b> (µm <sup>3</sup> )	17.0 ± 0.9	16.75 ± 0.32	16.81 ± 0.23	17.23 ± 0.14	17.35 ± 0.22	16.97 ± 0.20
<b>CHCM</b> (g%)	38.63 ± 0.14	38.22 ± 0.7	38.31 ± 0.18	39.00 ± 0.19	38.47 ± 0.21	39.29 ± 0.56
<b>PLT</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	993.2 ± 70.78	595.0 ± 102.5	913.8 ± 106.6	795.2 ± 131.9	801.0 ± 85.9	643.2 ± 64.1
<b>RDW</b> (%)	12.08 ± 0.32	13.7 ± 0.55	13.46 ± 0.34	13.34 ± 0.25	14.68 ± 0.17	12.13 ± 0.27
<b>WBC</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	10.58 ± 1.26	11.63 ± 2.71	12.76 ± 1.88	11.72 ± 1.07	13.24 ± 2.5	12.7 ± 2.37
<b>BN</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	0.31 ± 00.8	0.27 ± 0.02	0.198 ± 0.07	0.205 ± 0.05	0.49 ± 0.18	0.0
<b>SN</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	14.9 ± 8.8	6.19 ± 2.2	6.47 ± 1.1	7.38 ± 0.64	8.68 ± 2.09	5.41 ± 1.01
<b>LYMP</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	3.78 ± 0.50	3.60 ± 0.98	5.56 ± 1.09	3.33 ± 0.96	3.34 ± 0.72	6.82 ± 1.33
<b>MONO</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	0.36 ± 0.04	0.50 ± 0.15	0.32 ± 0.09	0.46 ± 0.07	0.39 ± 0.10	0.30 ± 0.08
<b>EOS</b> (x10 <sup>6</sup> mm <sup>3</sup> )	0.24 ± 0.05	0.33 ± 0.10	0.22 ± 0.04	0.32 ± 0.08	0.42 ± 0.13	0.15 ± 0.04
<b>Fe sérico</b> (µg/dl)	41.14 ± 3.09	47.99 ± 3.08	40.09 ± 3.66	30.81 ± 1.93	34.57 ± 0.56	37.08 ± 3.46

**RBC:** Hemácias; **Hb:** Hemoglobina; **Hct:** Hematocrito; **VCM:** Volume corpuscular médio; **RDW:** *Red Cell Distribution Width*; **HCM:** Hemoglobina corpuscular média; **CHCM:** Concentração da hemoglobina corpuscular média; **WBC:** Leucócitos totais; **SN:** Neutrófilos segmentados; **BN:** Neutrófilos bastonetes; **LYMP:** Linfócitos; **MONO:** Monócitos; **EOS:** Eosinófilo; **PLT:** Plaquetas.

Basófilos, mielócitos, e metamielócitos não foram detectados.

Acredita-se que em infecções intestinais, a etiologia da anemia associe-se, principalmente, à síndrome de má absorção e redução da ingestão alimentar. Como dito anteriormente, alguns autores acreditam que, a anemia seja, prioritariamente, ferropriva,

secundária à giardíase, e que somente se resolveria após reposição do ferro (Gheorghescu *et al.*, 1976; De Vizia *et al.*, 1985; Olivares *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2005; Monajemzadeh e Monajemzadeh, 2008), reforçando a hipótese da má absorção intestinal do mineral.

No modelo apresentado, a anemia foi uma característica marcante. É interessante salientar que na segunda semana houve queda dos valores hematimétricos, sem haver alteração do ferro sérico de modo significativo, aparentemente contrapondo a participação direta do mesmo no processo. Além disso, o peso dos animais não se alterou significativamente no curso da infecção (Figura 4). Dessa forma, a redução do ferro não pode ser atribuída à redução de ingestão alimentar.

Alteração significativa na morfologia das hemácias, a partir da medida do RDW, ocorreu precocemente, na primeira semana após a infecção, mantendo-se até a quarta semana, e retornando ao valor normal apenas após a cura dos animais. Este achado é frequente nas anemias, inclusive ferropriva, sendo conhecido que o RDW eleva-se antes das alterações hematimétricas e do ferro sérico (Cotton *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem haver outras vias que interferem no processo de anemia, associada à giardíase.

É importante ressaltar que esses achados são de um modelo experimental para avaliar a história natural da giardíase e as consequências da mesma sobre o perfil hematológico dos animais. Isso gera informações evolutivas desde a infecção até a cura parasitológica espontânea, o que ocorreu nesse modelo. Nota-se que os parâmetros avaliados começam a retornar aos valores basais após a cura parasitológica, reforçando que alterações inflamatórias e metabólicas induzidas pela *Giardia* possam estar associadas às alterações hematológicas observadas.

Infecções por *Giardia* apresentam quadros clínicos diversos e a anemia nem sempre é o desfecho na doença (Dos Santos e Vitore, 1996). As diferentes apresentações clínicas podem relacionar-se ao estado imune e nutricional do paciente, à cepa do parasito e ao tempo de infecção (Cevallos *et al.*, 1995; Cotton *et al.*, 2011; Koh *et al.*, 2013). Contudo, considerando que a infecção neste modelo foi, aparentemente, assintomática, resolvendo-se espontaneamente, acredita-se que a anemia seja uma característica marcante na giardíase. Portanto, a anemia deve ser investigada em crianças com giardíase com ou sem sintomas. Também em quadros de anemia em crianças sem etiologia definida, a giardíase deve ser investigada.

O fato do ferro sérico não ter se reduzido significativamente, do peso dos animais ter se

mantido e os valores hematimétricos iniciarem seu retorno para os valores basais, sem reposição desse íon, corrobora com a ideia de que a anemia na giardíase associa-se mais ao processo inflamatório do que à deficiência de ferro. O esclarecimento do mecanismo dessa anemia pode direcionar para vias terapêuticas mais eficientes para controlar as manifestações da doença.

Continuando a avaliação das variáveis hematológicas, não houve alterações significativas dos valores dos leucócitos totais ao longo do tempo do experimento, apesar de se observar uma elevação a partir do D7, que se manteve até o final (D35) (Tabela 4). Estes resultados seriam os esperados se considerarmos que a *Giardia* não invade tecidos, não induzindo infiltrado celular significativo (Cotton *et al.*, 2014, Dreesen *et al.*, 2012). Corroborando com esta idéia apresentou-se, anteriormente, os resultados negativos da dosagem da PCR e a contagem de leucócitos na lâmina própria dos animais ao longo da infecção (Figura 19).

Mas avaliando-se o número de células do infiltrado inflamatório, observou-se queda qualitativamente constante, mas não significativa estatisticamente, até o D21, voltando a se elevar no D28 (Figura 20).

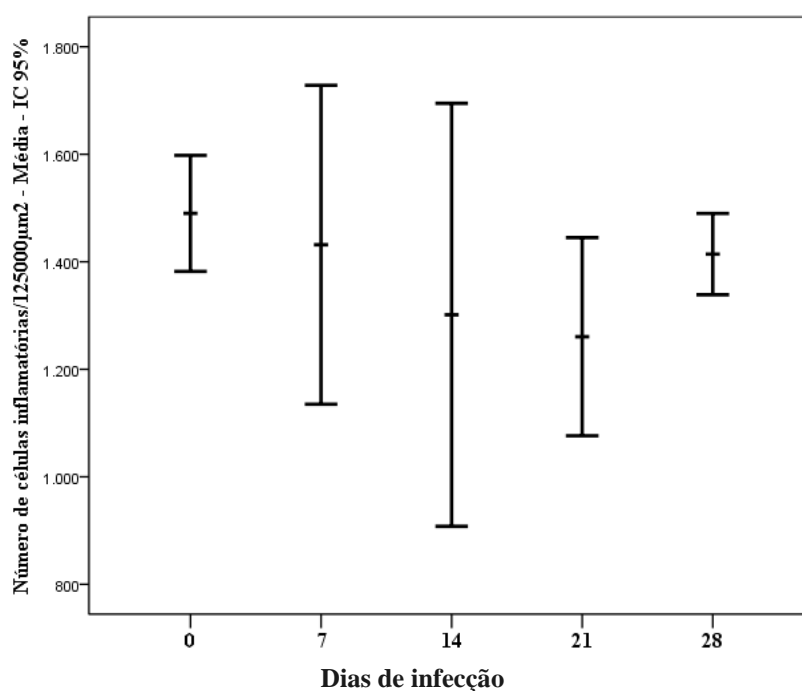


Figura 20 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do infiltrado inflamatório antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias) em 125.000 μm<sup>2</sup> de lâmina própria. \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Estes resultados poderiam se relacionar à virulência da cepa de *Giardia* usada para produzir a infecção. Nossa percepção foi que a inflamação foi mais discreta na maioria dos animais, sendo intensa em apenas alguns deles. Como hipotetizado anteriormente, esta cepa pode ter causado infecção assintomática nos animais (a infecção se resolveu espontaneamente), não tendo estimulado a resposta inflamatória local a nível de leucócitos intraepiteliais. Ainda, por um mecanismo desconhecido, pode ter ocorrido supressão da resposta inflamatória local. É preciso, ainda, salientar que não foi feita a contagem diferencial dos leucócitos intraepiteliais. Assim, poderia ter ocorrido um aumento pronunciado de algum tipo celular em detrimento da infecção.

O neutrófilo é o tipo de leucócito mais comum, representando, em média, de 45% a 75% dos leucócitos circulantes (Alberts *et al.*, 2002).

Quando temos um aumento do número de leucócitos totais, causado basicamente pela elevação dos neutrófilos, estamos provavelmente diante de um quadro infeccioso. Por terem um tempo de vida que varia entre 24-48 horas, assim que o processo infeccioso é controlado, a medula reduz a produção de novas células e seus níveis sanguíneos retornam rapidamente aos valores basais (1,3% a 5,2%) (Anexo 5).

Existem dois tipos de neutrófilos: os bastonetes (imatuross) e os segmentados (maduros).

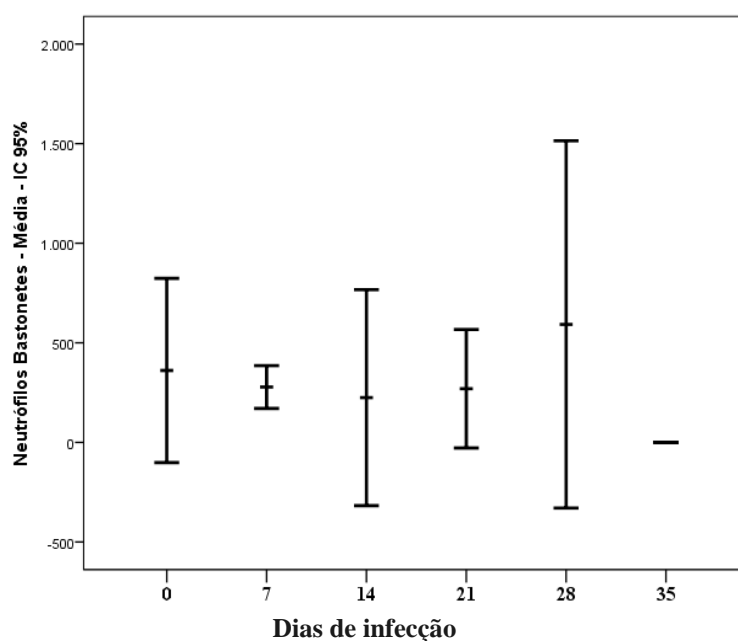


Figura 21 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do tamanho dos neutrófilos bastonetes antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Os neutrófilos bastonetes apresentaram uma queda significativa no D35 em relação ao D28 ( $p=0,015$ ) (Figura 21, Tabela 4).

A queda observada no número de neutrófilos bastonetes no D35 não tem uma racionalidade evolutiva para associá-la à infecção, uma vez que no D35 todos os animais estavam curados. Outra questão é que apesar desse achado ser significativo, os valores dos bastonetes mantiveram-se dentro dos limites da normalidade (Figura 21 e tabela 4).

Há fortes evidências de que há ativação de neutrófilos na infecção experimental e humana pela *G. lamblia*; entretanto, também há evidências de que esta ativação não tenha intensidade significativa e, geralmente, estudos histológicos mostram nenhum ou discreto infiltrado neutrofílico (Cotton *et al.*, 2014; Lopez-Romero *et al.*, 2015). Há fortes evidências de que a *G. lamblia* simultaneamente ativa o sistema imune inato e adaptativo, ao mesmo tempo em que inibe a ativação e migração de neutrófilos (Faubert, 2000). Conclui-se, assim, que a queda de neutrófilos observada não se relaciona à giardíase no presente modelo experimental.

Os eosinófilos apresentaram elevação não significativa, com pico na 4ª semana da infecção (Tabela 4). Comumente em infecções parasitárias ocorre elevação significativa de eosinófilos, principalmente em infecções com ciclo incluindo passagem pulmonar, ou com invasões teciduais importantes. Dos Santos e Vituri (1996) avaliaram índices hematológicos em crianças e adultos com giardíase. A eosinofilia foi observada somente em adultos. Apesar da elevação dos valores de eosinófilos não terem sido significativa neste modelo, acredita-se que outros estudos devem ser conduzidos buscando esclarecer sua participação na resolução da infecção.

Na giardíase, a resposta imune por células mononucleares (linfócitos e monócitos) é preponderante sobre a resposta por células polimorfonucleares (neutrófilo, eosinófilo e basófilo). Mas no estudo apresentado, também a contagem de mononucleares não apresentaram diferenças significativas durante o curso do experimento, ou seja, a giardíase não estimulou resposta linfocitária ou no aumento de monócitos.

Contrapondo com os resultados da contagem de células da lâmina própria, estão os resultados relacionados a produção de muco (Figura 22) e a relação criptas/vilosidades (Figura 23) que ficaram dentro das expectativas de uma infecção.

Os resultados obtidos nos animais controle tiveram um padrão celular na mucosa antral como esperado, sem infiltrado inflamatório. Nos animais infectados, os núcleos dos

tipos celulares normalmente presentes na lâmina própria da mucosa antral e núcleos de leucócitos recrutados pelo processo inflamatório foram contados, permitindo uma avaliação quantitativa da inflamação, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2012).

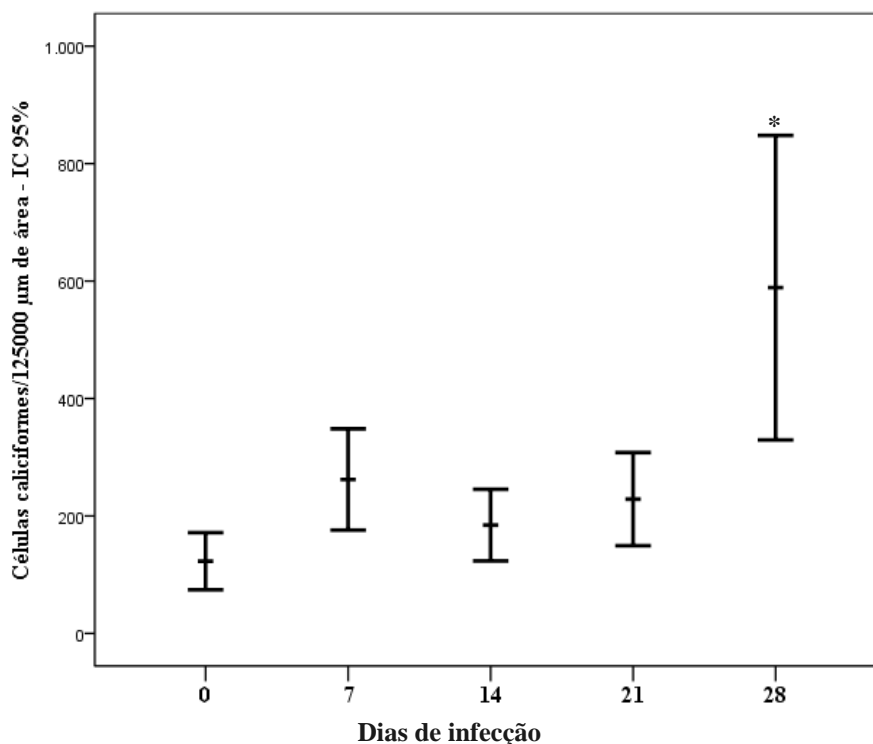


Figura 22 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média das células caliciformes antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Nos animais do grupo controle foram identificadas poucas células caliciformes no segmento duodenal do intestino delgado, o que é condizente com o que já era esperado, pois são menos frequentes no duodeno e aumentam de número em direção ao íleo.

Observou-se um aumento constante e significativo ao longo do período do estudo, embora tenha havido uma queda do D7 para o D14. O significativo aumento das células caliciformes no D28 deve ter sido estimulado pelo aumento de IL-4 em D21 (Figura 24). Juntamente com a IL-13, a IL-4 estimula os enterócitos a se diferenciarem em células caliciformes, aumentando a produção de muco no período seguinte (Brown e Hural, 1997).

A presença de microorganismos no intestino delgado leva a rápido aumento da secreção de mucina pelas células caliciformes (Turner, 2009). A presença da *Giardia* no

intestino levou ao aumento na produção de muco em animais de experimentação (Ventura *et al.*, 2013). O muco poderia funcionar como barreira à permanência da *Giardia*, impedindo os trofozoítos de alcançarem o epitélio intestinal (Roskens e Erlandsen, 2002). Contrapondo à função protetora do muco para o hospedeiro estão os achados de Zenian e Gillin (1985) e Zinneman e Kaplan (1972), que observaram função benfeitora do muco para os trofozoítos, protegendo-os contra a degradação por enzimas dos hospedeiros. Acredita-se que a função do muco na giardíase deva ser melhor investigada; contudo merece destaque a função do muco atuando desfavoravelmente ao parasito e contribuindo para a resolução da infecção em nosso modelo (Figura 22).

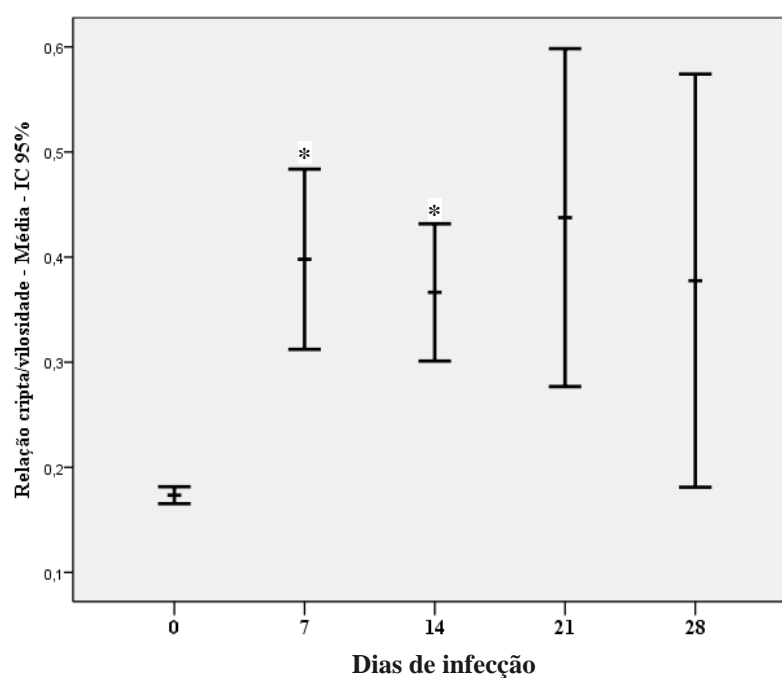


Figura 23 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média da relação cripta/vilosidade antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Nos animais do grupo controle a relação cripta/vilosidade foi significativamente menor que a razão observada nos animais ao longo da infecção. Uma queda não significativa foi observada do D7 ao D14 ( $p=1,000$ ). Os resultados deste estudo corroboram com achados de outros pesquisadores (Scott *et al.*, 2004) ao avaliarem a relação criptas/vilosidades em camundongos experimentalmente infectados com *G. lamblia*. As células das criptas hiperplasiam para regenerar os enterócitos. Estes resultados sugerem que esteja ocorrendo perda de o epitélio durante a infecção, ou seja, uma diminuições das vilosidades e aumento



das criptas. Ao exame microscópico não se observa alterações morfológicas sugestivas de necrose, podendo conduzir a especulação de dano dos enterócitos por apoptose.

Contudo, a *G. lamblia* pode induzir resposta inflamatória local e sistêmica (Lopez-Romero *et al.*, 2015). Leucócitos polimorfonucleares (PMN)<sup>21</sup> estão envolvidos em respostas inflamatórias e são essenciais para a defesa do hospedeiro contra muitos patógenos como bactérias e fungos. De fato, mutações genéticas ou terapia medicamentosa que resultam em comprometimento das funções dos PMN tornam os indivíduos altamente suscetíveis às infecções com risco de vida (Kostman, 1975; Zeidler *et al.*, 2009; Kuijpers e Lutter, 2012). Estas células têm sido implicadas numa variedade de doenças inflamatórias, inclusive intestinais (Fournier e Parkos, 2012; Szabady e McCormick, 2013). O recrutamento de PMN para os tecidos intestinais é um processo de várias etapas que envolve sua liberação pela medula óssea, saída da circulação, migração através dos tecidos hospedeiros e a migração transepitelial (Chin e Parkos, 2007; Summers *et al.*, 2010; Kolaczkowska e Kubes, 2013). Além disso, múltiplos mediadores são conhecidos por promover a acumulação de PMN nos tecidos. Durante as respostas inflamatórias agudas, fator estimulador de colônias de granulócitos (GCSF) promovem a saída de PMN da medula óssea e aumento do número de PMN circulantes (Wengner *et al.*, 2008; Mei *et al.*, 2012). A produção de interleucina-17A (IL-17A) por células do tecido residente aumenta os níveis circulantes de GCSF e promovem o egresso de PMN da medula óssea (Schwarzenberger *et al.*, 2000; Semerad *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2012).

Quimiocinas de PMN, contendo uma sequência consecutiva glutamateleucine-arginina (ELR + quimiocinas) (anexo 6) na sua região N-terminal, tal como CXCL1<sup>22</sup>, CXCL2, e IL-8 / CXCL8, são produzidas por uma variedade de células dentro da mucosa intestinal. Quimiocinas + ELR estão envolvidos em vários processos de recrutamento de PMN pelos tecidos (Wengner *et al.*, 2008; Ley *et al.*, 2007; Massena *et al.*, 2010; Kolaczkowska e Kubes, 2013; Chou *et al.*, 2010; McDonald *et al.*, 2010).

Uma pesquisa anterior sugeriu que produtos excretados e secretados pela *Giardia* induz a expressão de IL-8/CXCL8 pelas células do epitélio intestinal (Lee *et al.*, 2012). No entanto, tem sido demonstrado que trofozoítos de *Giardia* atenuam a secreção “*in vitro*” de IL-8/CXCL8 pelas células epiteliais em monocamadas (Fisher *et al.*, 2013; Cotton *et al.*,

---

<sup>21</sup> Os polimorfonucleares compreendem os granulócitos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

<sup>22</sup> A quimiocina (CXC) ligante 1 (CXCL1) é uma pequena citocina pertencente à família quimiocina CXC que foi chamada anteriormente GRO1 oncogene, GRO $\alpha$ , KC, neutrophil-activating protein 3 (PNA-3) e melanoma growth stimulating activity, alfa (MSG $\alpha$ - $\alpha$ ). Em humanos, esta proteína é codificada pelo gene CXCL1 (Haskill *et al.*, 1990).

2014). Outros estudos demonstraram que a protease de *Giardia* da família da catepsina B contribui para a degradação de IL-8/CXCL8 e atenua a quimiotaxia de PMN (Cotton *et al.*, 2014). A intensidade dessa resposta poderia relacionar-se à capacidade de algumas cepas em lesionar tecidos, ou seja, à virulência da cepa.

No presente modelo, o processo inflamatório gerado pela giardíase não conduziu alterações significativas nos valores relativos do leucograma. Apesar da ativação inflamatória sistêmica ter sido bem estabelecida nesse modelo, com a elevação de citocinas pró-inflamatórias, que podem ter sido ativadas por macrófagos e linfócitos (resultados apresentados logo em seguida), essa não foi suficientemente intensa para levar à alterações no valor do leucograma.

#### **5.4 Perfil de citocinas – 3ª fase**

Citocinas são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico durante o desencadeamento das respostas imunes. Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas, e endócrinas quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica (Zhang JM e An, 2007).

Algumas citocinas, como a IL-6, IL-12 e IL-17, desempenham um papel duplo na ativação de mecanismos tanto da imunidade inata quanto adaptativa (Watford *et al.*, 2013; Calabrese e Choy, 2016; Singer, 2016). Estudos anteriores em modelos animais de giardíase experimental têm relatado níveis elevados de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22 e IL-23 (Bienz *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003; Larocque *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007; Abdul-Wahid e Faubert, 2007; Kanda e Singer, 2009; Solaymani-Mohammadi e Singer, 2011; Kamda *et al.*, 2012; Dreesen *et al.*, 2012; Grit *et al.*, 2014; Cotton *et al.*, 2014; Grit *et al.*, 2014). No presente modelo, avaliou-se a expressão das citocinas: IL-4, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  no intestino delgado.

Na terceira fase de coleta de dados, foram avaliadas amostras de sangue de 38 animais machos, que serão apresentados segundo a seguinte disposição:

D0= Grupo controle, antes da infecção.

Grupos no tempo (dias): d7, d14, d21, d28, d35.

### 5.4.1 Avaliação global

A IL-4 elevou-se lentamente, mas progressivamente, atingindo diferença significativa em relação ao controle na 3ª semana (D21), mantendo-se significativamente elevada até a 5ª semana (D35) (Figura 24).

A IL-4 é importante estímulo para a produção de anticorpos IgE e para o desenvolvimento de células Th2 e ativação de células T auxiliares CD4<sup>+</sup>naives (Finkelman *et al.*, 1988). É produzida pelos linfócitos CD4<sup>+</sup> do subgrupo Th2, e por mastócitos ativados. As principais ações biológicas da IL-4 são: estimular a troca de classe da cadeia pesada da imunoglobulina M para o isótipo IgE, lembrando que a IgE desempenha um papel na defesa contra infecções por helmintos e artrópodes sendo também o principal mediador nas reações de hipersensibilidade imediata; estimula o desenvolvimento de células Th2 de células CD4<sup>+</sup>naives, além de funcionar como fator de crescimento autócrino para células Th2 diferenciadas; juntamente com a IL-13 ativa de forma alternativa os macrófagos, aumentando a eficácia destes na fagocitose de microrganismos. Também estimulam os enterócitos a se diferenciarem em células caliciformes, aumentando a produção de muco (Brown e Hural, 1997).

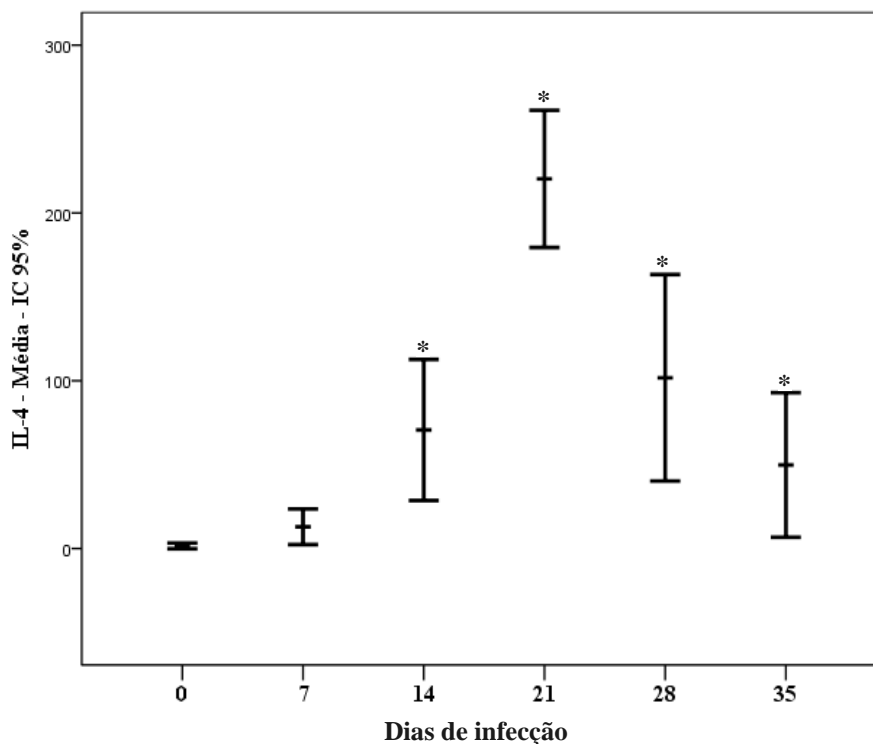


Figura 24 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-4 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Observou-se neste estudo que parece haver ativação de macrófagos teciduais no intestino e, provavelmente, de linfócitos-T, com liberação de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , com pico no D21 (Figura 27). Comportamento semelhante se vê com o TGF- $\beta$  que tem ações predominantemente anti-inflamatórias, produzido por células T estimuladas por diversos antígenos como o LPS e outros tipos celulares (Figura 26). Provavelmente, antígenos da *Giardia* levariam ao estímulo destas células. A resposta pró-inflamatória é estimulada simultaneamente à resposta anti-inflamatória (Yoshimura e Muto, 2011).

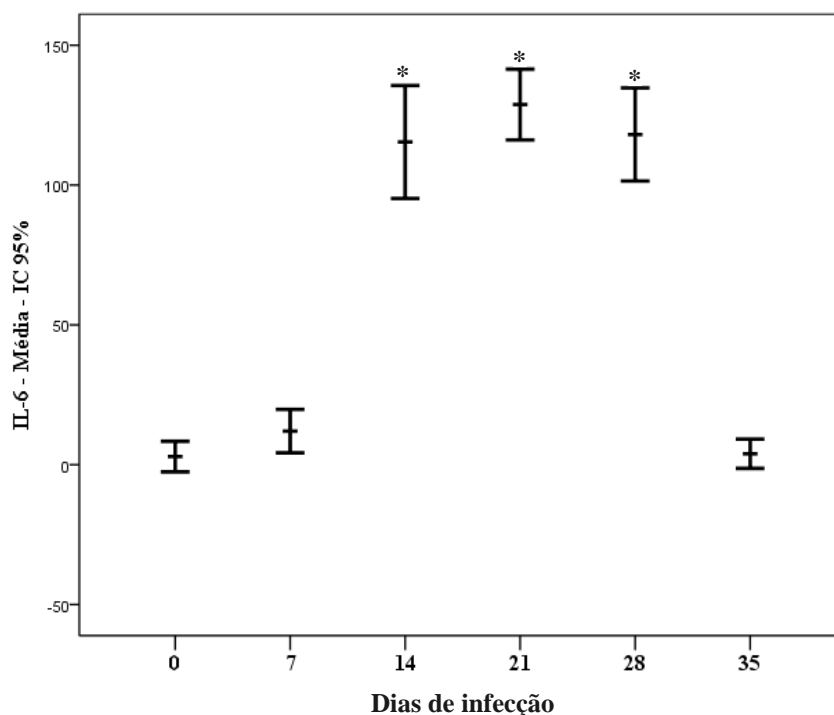


Figura 25 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-6 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Houve alterações significativas dos valores da IL-6 a partir da 2ª semana de infecção, mantendo-se elevada durante todo o período de infecção documentada (D14 a D28), com queda para valores próximos ao do controle no D35, quando a cura parasitológica foi alcançada (Figura 25).

A IL-6 é produzida por muitos tipos celulares, incluindo fagócitos mononucleares ativados, células endoteliais e fibroblastos, presentes tanto na imunidade natural como na adquirida. As principais ações da IL-6 são: estimular a produção de proteínas de fase aguda,

pelos hepatócitos, contribuindo para a resposta de fase aguda; estimular a produção de neutrófilos pelos progenitores da medula óssea, juntamente com fatores estimuladores de colônias; estimular o crescimento de linfócitos B produtores de anticorpos; pode ainda estar associada ao desenvolvimento de neoplasias plasmocitárias, atuando como fator de crescimento de plasmócitos neoplásicos (mieloma múltiplo); estimular a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (principalmente a IL-17); inibir ações de células T reguladoras (ação pró-inflamatória) (Simpson *et al.*, 1997).

O achado da elevação significativa da IL-6 nesse experimento é corroborado por outros estudos, sendo importante fator na ativação da resposta Th-17, que tem papel significativo na imunidade contra a *G. lamblia* (Simpson *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2007; Khader *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2011).

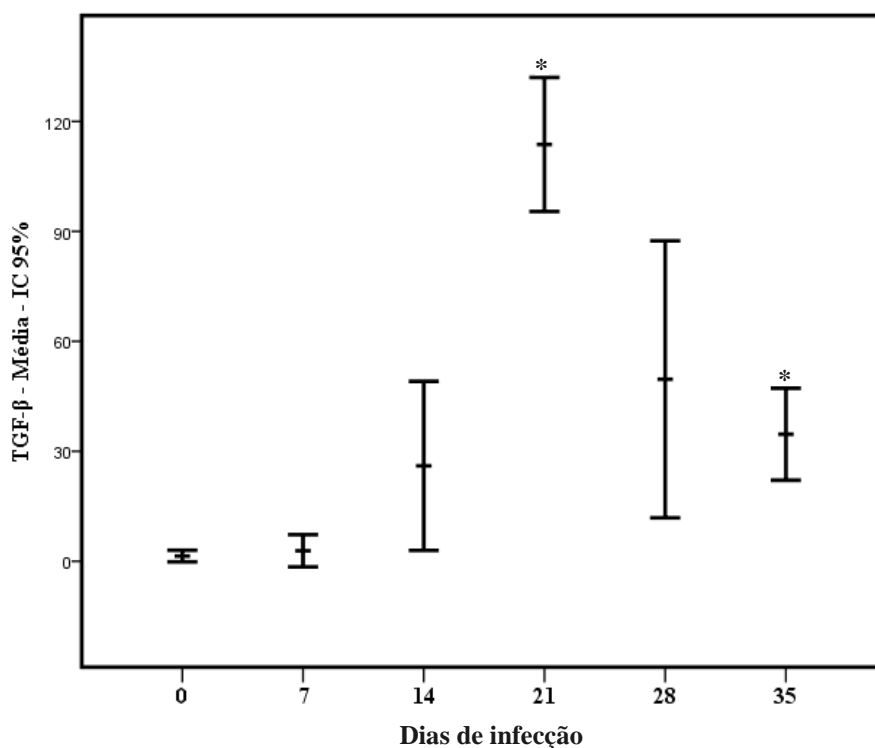


Figura 26 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do TGF- $\beta$  antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

O TGF- $\beta$  eleva-se significativamente a partir do D14, atinge um pico no D21, se reduz até o D35, mas mantendo valores acima dos valores do controle (Figura 26).

O TGF- $\beta$  possui atividade imunossupressora, sendo sintetizado e secretado por células

T estimuladas por antígenos, fagócitos mononucleares ativados e vários outros tipos celulares como células T reguladoras (Letterio e Roberts 1998). Assim, as principais ações biológicas do TGF- $\beta$  incluem: inibir a proliferação e a função efetora de células T e a ativação de macrófagos; regular a diferenciação de subconjuntos funcionalmente distintos de células T, associada à regulação da sobrevivência de células T reguladoras, podendo bloquear o desenvolvimento dos subconjuntos Th1 e Th2 de células T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, pode ter também efeito pró-inflamatório quando em combinação com outras citocinas inflamatórias como a IL-6; promover a diferenciação de um subconjunto pró-inflamatório de células T CD4<sup>+</sup> que secretam IL-17. O TGF- $\beta$  ainda estimula a produção de anticorpos IgA, induzindo células B a trocarem para esse isótipo e regula a reparação tecidual, após a regressão das reações imunológicas e inflamatórias, no sítio da lesão (Yoshimura e Muto, 2011).

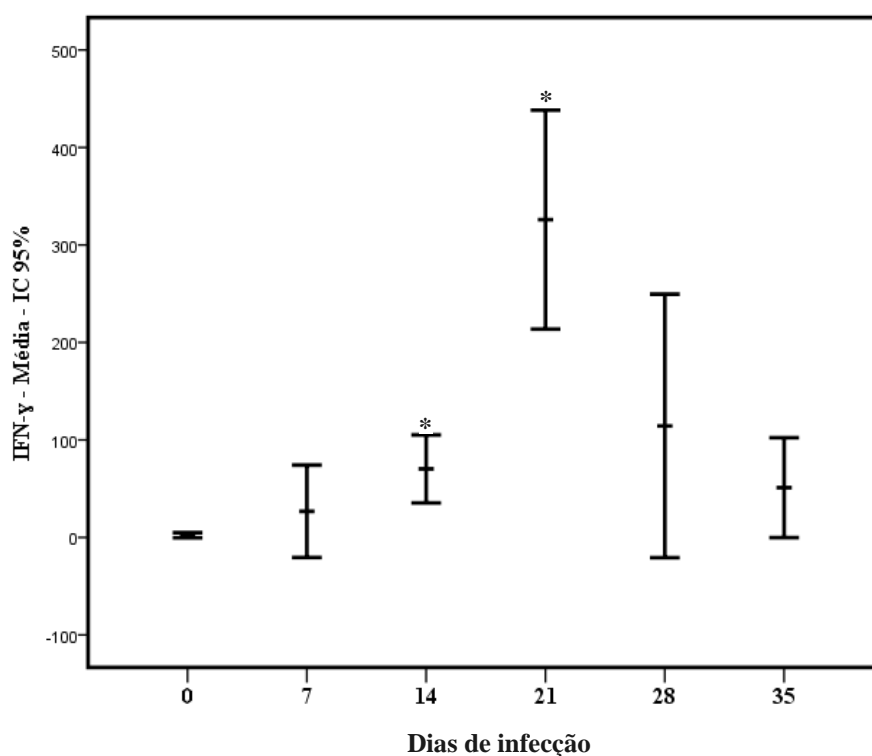


Figura 27 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do Interferon- $\gamma$  antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

O IFN- $\gamma$  eleva-se já na 1<sup>a</sup> semana (D7), mas não significativamente e continua a elevar-se, significativamente, a partir da 2<sup>a</sup> semana (D14), atingindo um pico na 3<sup>a</sup> semana (D21), e cai, significativamente, até a 5<sup>a</sup> semana (D35), quando ainda mantém-se elevado, mas sem significância estatística (Figura 27).

O IFN- $\gamma$  é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade natural e na imunidade adquirida mediada por células, principalmente contra microrganismos intracelulares. É produzido por células NK, células Th1 CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>. As células NK produzem IFN- $\gamma$  em resposta a ligantes ativados nas superfícies de células hospedeiras infectadas ou estressadas, ou em resposta à IL-12 e, nesse cenário, age como um mediador da imunidade natural. Na imunidade adquirida, o IFN- $\gamma$  é produzido em resposta ao reconhecimento antigênico e a produção é acentuada pela IL-12 e IL-18. As principais ações biológicas do IFN- $\gamma$  são: ativar os macrófagos para destruir microrganismos fagocitados por diversos mecanismos; promover a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> *naïves* para o subgrupo Th1 e inibir a produção de células Th2; agir nas células B para promover a troca para certas subclasses de IgG; estimular a expressão de moléculas do MHC classes I e II, aumentando a capacidade do organismo de reconhecimento antigênico e de adesão das células T (Abul *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2005; Mitcham, 2005).

Estudos anteriores com modelo experimental para giardíase mostraram elevados níveis de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-5, IL-4, IL-2, IL-13, IL-17, IL-22 e IL-23 (Larocque *et al.*, 2003; Bienz *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007; Abdul-Wahid e Faubert *et al.*, 2007; Kamda e Singer, 2009; Solaymani-Mohammadi e Singer, 2011; Kamda *et al.*, 2012; Grit *et al.*, 2014; Cotton *et al.*, 2014).

IFN- $\gamma$  and IL-4 são as principais citocinas produzidas durante a resposta Th1 e Th2, respectivamente, e parecem desempenhar um papel na giardíase pois seus níveis ficam elevados em modelos infectados (Bienz *et al.*, 2003; Solaymani-Mohammadi e Singer, 2011; Jimenez *et al.*, 2014). Contudo, ratos deficientes em IFN- $\gamma$  e IL-4 podem eliminar o parasito normalmente, sugerindo que nem as respostas Th1 nem Th2 são absolutamente necessárias para a eliminação da *Giardia* (Singer e Nash, 2000a).

A IL-11 elevou-se, significativamente, na 1<sup>a</sup> semana (D7), com pico na 2<sup>a</sup> semana, porém apresentou queda rápida e significativa na 3<sup>a</sup> semana, mantendo-se significativamente mais baixa do que os controles na 5<sup>a</sup> semana (D35) (Figura 28).

A IL-11 é produzida pelas células do estroma da medula óssea. Estimula a megacariocitose (produção de plaquetas). Está em uso clínico para tratar pacientes com deficiência de plaquetas (plaquetopenia) pós quimioterapia para câncer. Sua função no sistema imune não está bem definida, apesar de utilizar a mesma subunidade gp130 usada pela IL-6, e sinalizar por uma via Jak/STAT, cujos mecanismos complexos estão ligados à

imunidade natural, ainda não bem estabelecidos (Karpovich *et al.*, 2003).

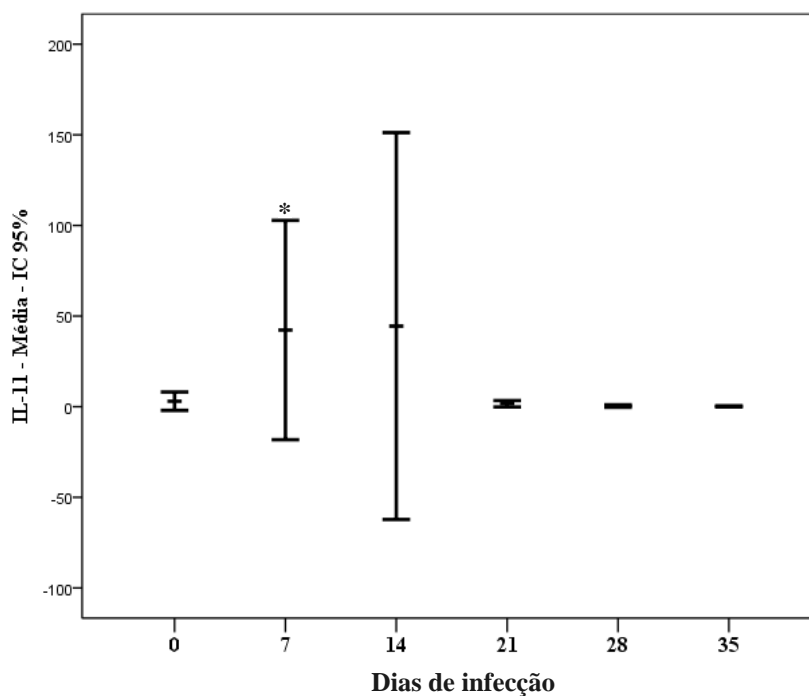


Figura 28 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-11 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Não houve alterações significativas dos valores da IL-12, ao longo do tempo do experimento, entretanto notou-se uma discreta elevação da mesma ao longo do tempo, com um pico no D28, porém sem significância estatística.

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune natural inicial a microrganismos intracelulares e é um indutor essencial da imunidade mediada por células à resposta imune adquirida a esses microrganismos. É produzida principalmente pelas células dendríticas e macrófagos ativados, ou seja, é produzida por células apresentadoras de antígenos (sigla em inglês APC), quando estas apresentam antígenos para células T nas fases indutora e efetora das respostas imunes mediadas por células. Originalmente, foi identificada como ativador da função citotóxica das células NK. Entretanto, a sua ação mais importante é estimular a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e suportar a diferenciação de células T auxiliares CD4<sup>+</sup>naives para o subconjunto produtor de INF- $\gamma$  (Th1). As principais ações biológicas da



IL-12 são: estimular a produção de INF- $\gamma$  pelas células NK e linfócitos T. Assim, a resposta dos macrófagos e células dendríticas aos microrganismos leva à produção pelas mesmas de IL-12, que estimula as células NK e células T a produzirem INF- $\gamma$ , e esse ativa os macrófagos com subsequente destruição do microrganismo (Janeway *et al.*, 2005).

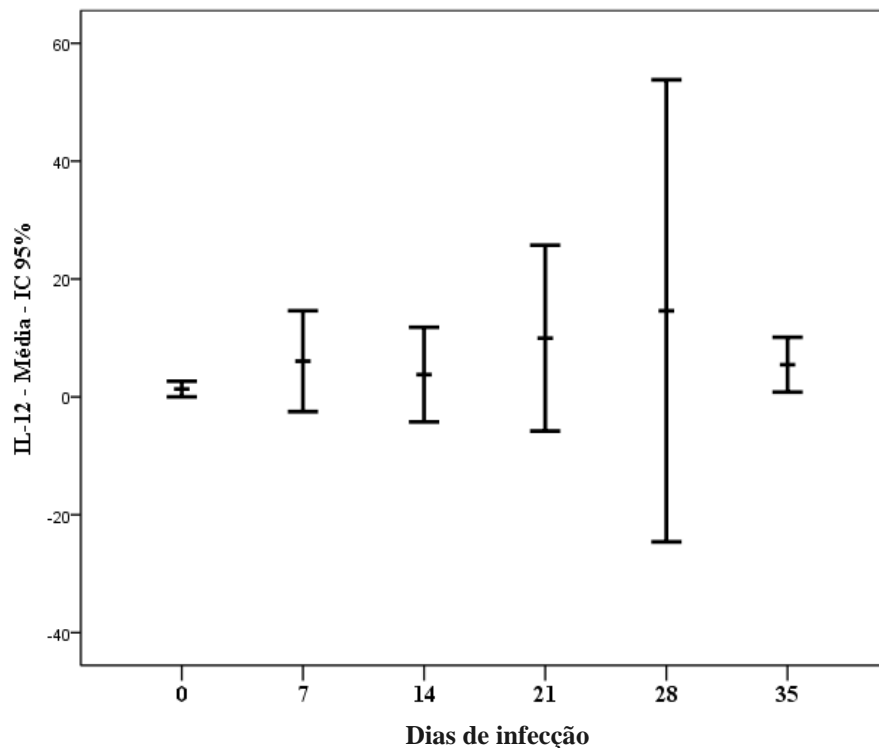


Figura 29 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-12 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Não foi detectada ativação da produção da IL-12 de modo significativo, e o aumento que se vê parece ser tardio, com pico na 4ª semana pós-infecção. Como essa resposta ocorre precocemente e é mais importante no linfonodo onde os linfócitos T estão sendo primados, pode ser que o estudo da sua expressão no tecido possa não representar sua real função biológica. A IL-12 é produzida em resposta à sinalização por TLR (Toll-like receptor) (Janeway *et al.*, 2005), importante principalmente em resposta à infecções por microrganismos intracelulares, bactérias e vírus, e que talvez não seja significativa na infecção por *Giardia*.

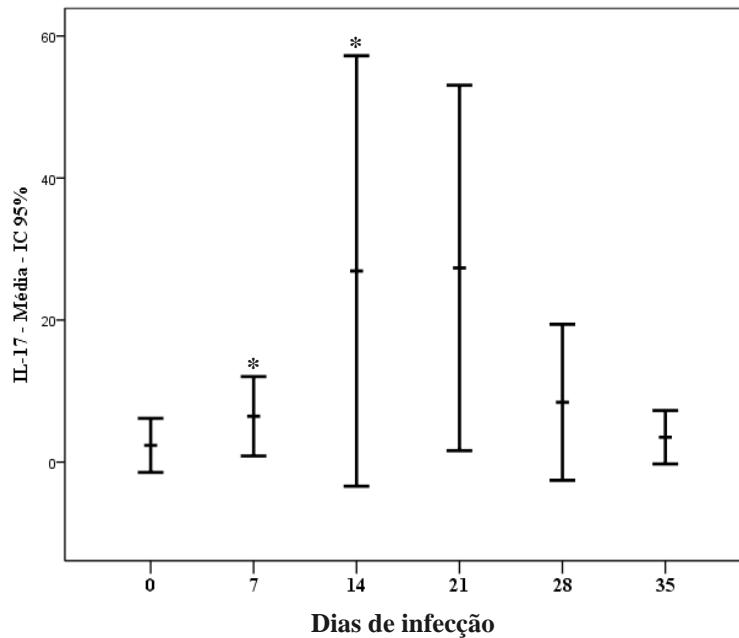


Figura 30 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IL-17 antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Houve alterações significativas da IL-17, ao longo do experimento. Ela eleva-se já na 1ª semana (D7) após a infecção, continua elevando-se, significativamente, até a 2ª (D14), com um platô bem definido até a 3ª semana (D21), voltando progressivamente ao valor semelhante ao do grupo controle, a partir do D28, até o D35.

A IL-17 consiste em uma família de 6 citocinas estruturalmente relacionadas. Algumas promovem dano tecidual em doenças de hipersensibilidade; outras são importantes na defesa contra infecções bacterianas. As estruturas das IL-17 e seus receptores não são compartilhados por outras citocinas e as vias de transdução de sinal que esses receptores empenham não são completamente conhecidos (Singer, 2016). Os membros mais bem caracterizados dessa família são a IL-17A e IL-17F, produzidos por diversos tipos celulares, incluindo um subconjunto de células T CD4<sup>+</sup> efectoras, distintas das células Th1 e Th2. A diferenciação e manutenção das células produtoras de IL-17 são dependentes da TGF- $\beta$ , IL-23 e outras citocinas da imunidade natural como a IL-6. As principais ações biológicas das IL-17 (IL-17A e IL-17F) são: estimulam as células endoteliais e macrófagos a produzirem IL-1, TNF e várias quimiocinas que promovem recrutamento de neutrófilos; induzem várias células a produzirem citocinas hematopoiéticas que estimulam a produção de neutrófilos pela medula óssea. A IL-17 produzida pelas células T que é considerada a responsável pela inflamação

destrutiva característica de alguns modelos murinos de doença autoimune, parece ter papel na doença inflamatória intestinal humana (Gaffen, 2008; Singer, 2000 a,b).

O trabalho de Singer (2016) sobre infecções pela *G. lamblia* mostra que a IL-17 parece ser essencial para o controle dessa infecção, constituindo fator importante que liga as respostas imunes celulares e humorais. Ele implica as citocinas IL-17A e o fator de necrose tumoral (TNF), como contribuintes para a imunidade protetora, apesar de não serem as mais abundantes citocinas detectadas nos sobrenadantes da cultura. Os mecanismos envolvidos no controle tanto da infecção como da produção de sintomas não são bem compreendidos, embora as respostas imunitárias sejam consideradas importantes para ambos (Gaffen, 2008).

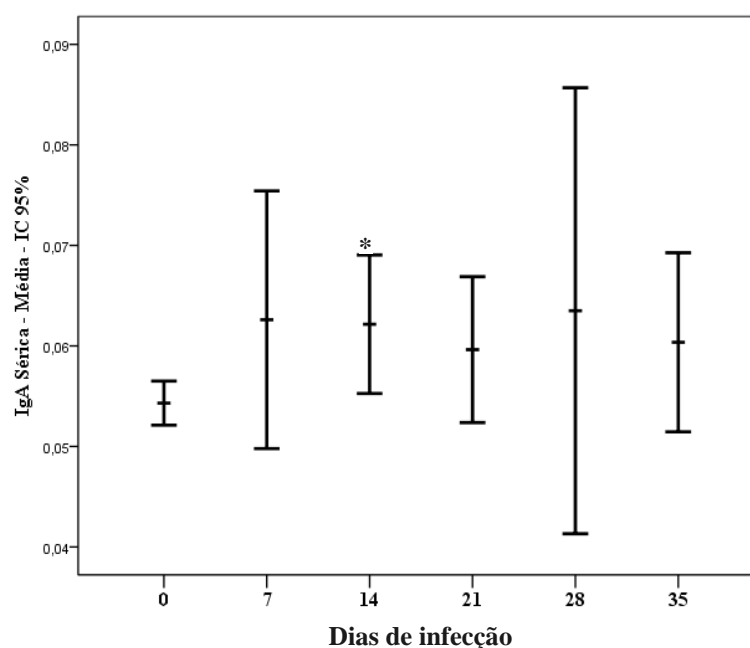


Figura 31 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IgA sérica anti-*Giardia* antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

Houve elevação da IgA sérica, a partir do D7, atingindo significância estatística apenas no D14, e mantendo-se elevada até o final do experimento, porém sem diferença estatisticamente significativa a partir do D14 (Figura 31).

A ativação do sistema imune com ativação de linfócitos para a produção de imunoglobulinas é bem estabelecida, e aqui parece que esse estímulo torna-se significativo com elevação significativa da IgA sérica a partir da 2ª semana (D14), e mantendo-se elevada, mas sem significância estatística.

Infecções pela *Giardia* em seres humanos e modelos animais são caracterizadas por abundante produção de IgA antiparasitário. Muito desse anticorpo é dirigido contra as isoformas das proteínas variantes de superfície (VSP), uma proteína rica em cisteína que reveste a superfície do parasito. Cada trofozoíto de *Giardia* carrega de 150 a 200 genes diferentes que codificam para VSP, mas apenas um é expresso na superfície do parasito de cada vez. Estas variações são seleccionadas “*in vivo*” pela IgA e a capacidade de mudar a expressão VSP permite ao parasito escapar do sistema imune do hospedeiro (Rivero *et al.*, 2010; Adam *et al.*, 2010).

O principal estimulante para a expressão do IgA secretório anti-*Giardia*, presente na luz intestinal do hospedeiro infectado, são as proteínas  $\alpha$ -1-giardinas presentes no disco ventral e membrana plasmática do parasito. Do mesmo modo que utiliza para evadir da ação do IgA sérico, o parasito modula, com sucesso, a expressão das VSP's para confundir o sistema imune e tornar sem efeito o combate ao microorganismo. Essa modulação pode levar a uma baixa produção de IgA, tanto sérico quanto fecal. No presente estudo, ao analisar os níveis de IgA fecal dos animais infectados, observou-se uma tendência de elevação já na primeira semana, mas parece que houve uma eficiente modulação das VSP's fazendo com que, nos períodos seguintes, essa variação não fosse significativa estatisticamente (Figura 31).

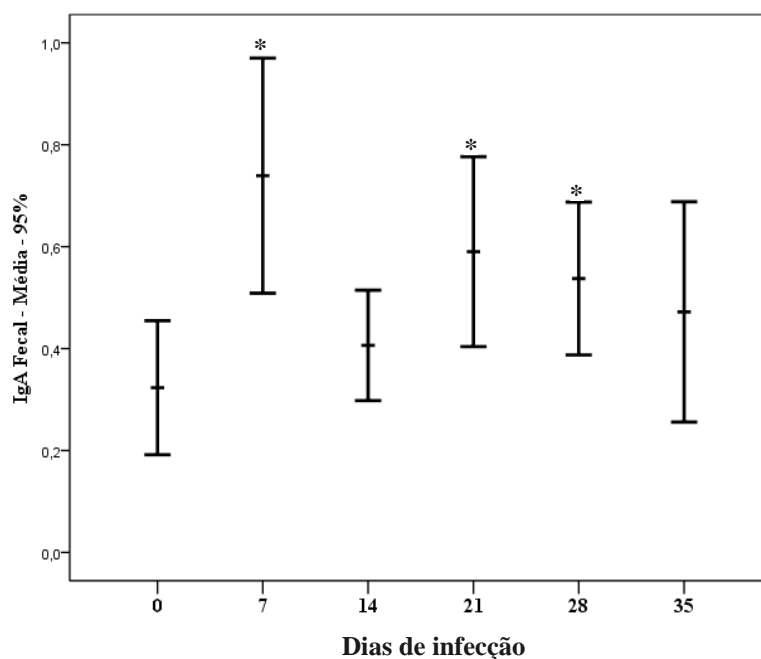


Figura 32 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IgA secretória anti-*Giardia* antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

A IgG eleva-se muito rapidamente e precocemente de modo significativo, porém mantém-se em níveis significativamente elevados, mesmo após a cura no D35, mostrando que o estímulo para a sua produção ( $\alpha$ -1-giardininas presentes no disco ventral e membranas plasmáticas) ainda se mantém por algum tempo após a cura.

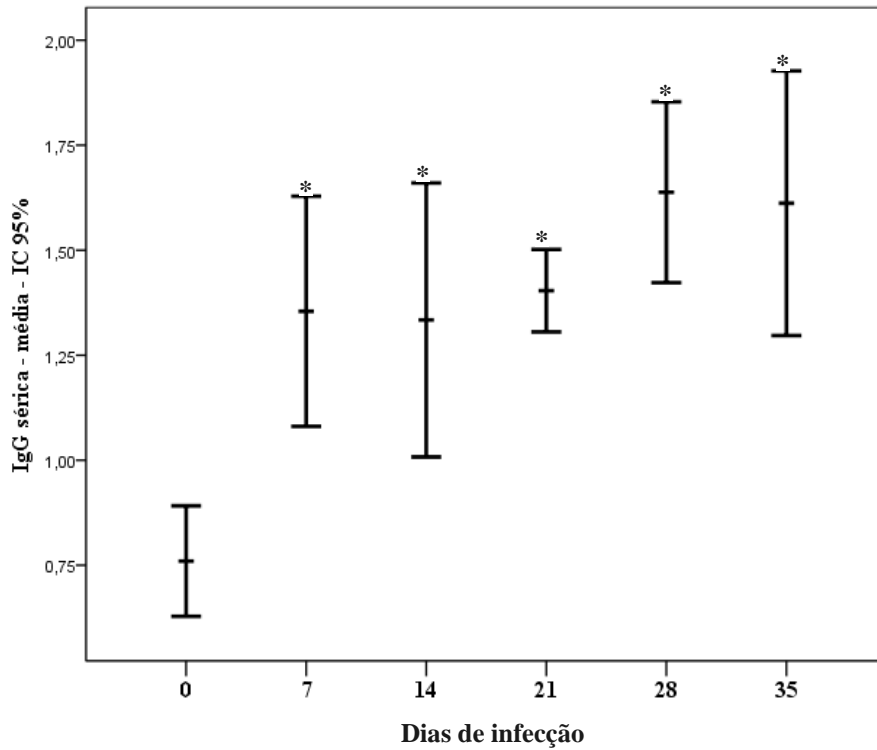


Figura 33 – Progressão da giardíase em gerbilos infectados experimentalmente. Média do IgG sérica anti-*Giardia* antes da infecção (D0) e após diferentes tempos de infecção (D7=7 dias, D14=14 dias, D21=21 dias, D28=28 dias, D35=35 dias). \* Diferença significativa com valores de linha de base (tempo 0).

A IgE não foi detectável, nem nas fezes, nem no soro.

## **6. CONCLUSÃO**

A giardíase foi responsável por um processo inflamatório a partir da 2ª e 3ª semanas de infecção.

No nosso modelo a infecção foi autolimitada, sendo resolvida a partir dos 30 dpi. Acreditamos que a cepa usada produziu infecção assintomática nos animais, pois não foi observado alterações das fezes, do peso e da pelagem dos mesmos.

Glicemia e insulinemia foram observadas a partir da 3ª semana de infecção, reforçando a participação ativa da *Giardia* no processo inflamatório, gerando aumento da resistência insulínica.

A PCR (proteína C reativa) não se mostrou bom marcador para giardíase.

A giardíase em nosso modelo levou a um quadro marcante de anemia que se iniciou a partir da segunda semana de infecção. Houve queda progressiva e significativa do número de hemácias, hemoglobina e hematócrito até o D28, mas sem alteração do ferro sérico de modo significativo. Estes resultados sugerem que o processo inflamatório produzido pode ter induzido essas alterações hematológicas.

Em nosso modelo, o processo inflamatório gerado pela giardíase não conduziu a alterações significativas nos valores relativos do leucograma. Apesar da ativação inflamatória sistêmica ter sido bem estabelecida com a elevação de citocinas pró-inflamatórias, que podem ter sido ativadas por macrófagos e linfócitos, esta não foi suficientemente intensa para levar a alterações no valor do leucograma.

Contudo, considerando que a infecção em nosso modelo foi aparentemente assintomática, resolvendo-se espontaneamente, acreditamos que a anemia foi o principal achado do trabalho. Nesse contexto, a anemia deve ser investigada em crianças com giardíase com ou sem sintomas. Também em quadros de anemia em crianças sem etiologia definida, giardíase deve ser investigada.

## **7. REFERÊNCIAS**



- Abe N e Teramoto I (2012). Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage bat the rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitol Res*, 110:1025-1028.
- Abdul-Wahid A e Faubert G (2007). Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine*; 25: 8372–8383.
- Abul KA, Lichtman AH, Pober JS (2000) *Cellular and Molecular Immunolgy*, Fifth Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Acha PN, Szyfres B (1987). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Washington: Pan American Health Organization (Scientific Publication n° 503). apud Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A., Mendis, A.H.W. 1975. *Giardia* and Giardiasis. *Adv. Parasitol.*, v. 32, p. 71-160, 1987.
- Adam RD (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*; v14: 447–475.
- Adam RD, Nigam A, Seshadri V, Martens CA, Farneth GA, Morrison HG, Nash TE, Porcella SF, Patel R (2010). The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC Genomics*. 11:424.
- Aguilar-Diaz H, Carrero JC, Argüello-Garcia R, Lacleste JP, Morales-Montor J (2011). Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitology*, 27(10): 450-458.
- Ajjampur SS, Koshy B, Venkataramani M, Sarkar R, Joseph AA, Jacob KS, Ward H, Kang G (2011). Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical growth in children in a semi-urban slum in south India. *Ann Trop Paediatr*; 31: 205-212.
- al Agha R e Teodorescu I (2000). Intestinal parasites infestation and anemia im primary school children in Gaza Governorates – Palestine. *Roum Arch Microbiol Immunol*. Jan-Jun;59(1-2):131-43.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "Leukocyte also known as macrophagesfunctions and percentage breakdown". *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Al-Ezzy AIA, Abood WN, Hussein RA (2015). C-Reactive Protein as an Immunopathological Prognostic Marker for *Giardia Lamblia* and *Entamoeba Histolytica* Associated Diarrhea among Children of Baghdad Governorate. *International Journal of Advances in Scientific Research*. v1:1. p33-37.

- Amorim RMR, Silva DAO, Taketomi EA, Morato MGVA, Mundim MJS, Ribeiro DP, Oliveira TC, Viana JC, Gomes MA, Cury MC (2010). *Giardia duodenalis*: Kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. *Experimental Parasitology* 125:297–303.
- Andersen YS, Gillin FD e Eckmann L (2006). Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun.*; 74:2473–2476.
- Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K e Svard SG (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*; 8: 413–422.
- Araújo NS, Mundim MJS, Gomes MA, Amorim MRR, Viana JC, Queiroz RP, Rossi MA, Cury MC (2008). *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. *Exp. Parasitol.*, 118:449-57.
- Armah SM, Carriquiry A, Sullivan D, Cook JD e Reddy MB (2013). A Complete Diet-Based Algorithm for Predicting Nonheme Iron Absorption in Adults. *The Journal of Nutrition*. American Society for Nutrition. 143: 1136–1140.
- Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol.*;133:145-52.
- Assis EM, Oliviera RC, Moreira LE, Pena JL, Rodrigues LC, Machado-Coelho GL (2013). Prevalence of intestinal parasites in the Maxakali indigenous community in Minas Gerais, Brazil, 2009. *Cad. Saude Publica*. Apr;29(4):681-90.
- Baldissera MD, Silva AS, Oliveira CB, Vaucher RA, Santos RCV, Duarte T, Duarte MMMF, França RT, Lopes STA, Raffin RP, Boligon AA, Athayde ML, Stefani LM, Monteiro SG (2014). Effect of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the longevity and immune response of rats infected by *Trypanosoma evansi*. *Research in Veterinary Science* 96: 501–506.
- Baldursson S e Karanis P (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res*, 45(20): 6603-6614.
- Bansal D, Bhatti HS, Sehgal R (2005b). Altered lipid parameters in patients infected with *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Giardia lamblia*. *Br J Biomed Sci* in press.

- Bansal DB, Bhatti HS e Sehgal R (2005a). Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids in Health and Disease* 2005, 4:10.
- Baqai R, Zuberi SJ, Kazmi SU (1996). Serum immunoglobulin levels in giardiasis. *J Pak Med Assoc. Feb*;46(2):41-2.
- Baum KF, Berens RL, Marr JJ, Harrington JA e Spector T (1989). Purine deoxynucleoside salvage in *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p.21087-21090.
- Beaver PC, Jung RC, Cupp EW (1984). *Clinical Parasitology*. Lea & Febiger, 600 Washington Square Philadelphia, PA 19106 USA.
- Benere E, Van Assche T, Cos P e Maes L (2012). Intrinsic susceptibility of *Giardia duodenalis* assemblage subtypes A(I), A(II), B and E (III) for nitric oxide under axenic culture conditions. *Parasitol Res*; 110: 1315–1319.
- Berkman DS; Lescano AG; Gilman RH; Lopez SL (2003). Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet* 359, 564–571.
- Bernander R, Palm JE, Svard SG (2001). Genome ploidy in different stage of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol.*, 3:55-62.
- Berrilli F, Di Cave D, Cavallero S e D'Amelio S (2012). Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Front Cell Infect Microbiol*; 2:141.
- Biadun W (1990). Studies of serum lipids in guinea pigs with larval ascariasis. *Wiad Parazytol.*, 36:15-26.
- Bienz M, Dai WJ, Welle M, Gottstein B e Muller N (2003). Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. *Infect Immun.*; 71: 1569–1573.
- Blumberg RS, Lencer WI, Zhu X, Kim HS, Claypool S, Balk SP, Saubermann LJ, Colgan SP (1999). Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol Lett*; 69(1): 7–11.
- Bradford MM (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brown MA e Hural J (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol.*;17(1):1-32.
- Buret A, Amat C, Manko A, Beatty J, Halliez MM, Bhargava A, Motta J-P, Cotton J. (2015).

*Giardia duodenalis*: new research developments in pathophysiology, pathogenesis, and virulence factors. *Curr Trop Med Rep.* 2:110–118.

Buret A, Olson ME, Gall DG, Hardin JA (1998). Effects of orally administered epidermal growth factor on enteropathogenic *Escherichia coli* infection in rabbits. *Infect Immun*; 66:4917–23.

Buret AG (2007). Mechanisms of epithelial dysfunction in Giardiasis. *Gut*; 56:316–317.

Buret AG, Scott KG-E, Chin AC (2002). Giardiasis: pathophysiology and pathogenesis *Giardia*, the cosmopolitan parasite. CAB International, In: Olson B, Olson ME, Wallis PM, eds, Wallingford, UK; 109–27.

Busatti HGNO (2006). Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol. Belo Horizonte – MG. 63p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – 2006.

Busatti HGNO, Alves RJ, Santana-Anjos KG, Gil FF, Cury MC, Vannier-Santos MA, Gomes MA (2013). Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Feb;75(2):160-4.

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

Cacciò SM, Ryan U (2008). Molecular epidemiology of Giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*;160:75–80.

Cacciò SM, Thompson RCA, McLauchlin J and Smith HV (2005). Unraveling *Cryptosporidium* and *Giardia* Epidemiology. *Trends in Parasitology*; 21, 430-437.

Calabrese LH e Choy E (2016). The Roles For IL-6 In Both Innate And Adaptive Immunity In RA. Fonte: [https://www.raandil6.com/-/media/EMS/Conditions/Rheumatoid%20Arthritis/Unbranded/pdf/IandA\\_Monograph\\_WEB\\_Q24%20pdf.pdf?la=en](https://www.raandil6.com/-/media/EMS/Conditions/Rheumatoid%20Arthritis/Unbranded/pdf/IandA_Monograph_WEB_Q24%20pdf.pdf?la=en)

Caliari, MV (1997). Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora UFMG. 149p.

Cardoso GS, Santana ADC, Aguiar CP (1995). Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 28:25-31.

Carranza PG e Luján HD (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*.

Microbes and Infection, 12:71-80.

Cavalier-Smith T (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European J. Protist.* 39, 338–348.

Cedillo-Rivera R, Leal YA, Yopez-Mulia L, Gómez-Delgado A, Ortega-Pierres G, Tapia-Conyer R, Muñoz O (2009). Seroepidemiology of Giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*; 80: 6–10.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010). Giardiasis Surveillance - United States, 2006–2008. *Surveillance Summaries, MMWR*, 59(SS-6).

Cevallos A, Carnaby S, James M, Farthing JG (1995). Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterology*. 109,766–773.

Cheeramakara C, Nontprasert A, Siripanth C, Tanomsak W, Chularerk U, Sucharit P, Areekul S (2004). The hematological status, plasma vitamin B12 and folic acid levels, and intestinal pathology in rats infected with *Giardia lamblia*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 35 (4): 811-6.

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

Chin AC e Parkos CA (2007). Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol* 2: 111–143.

Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG (2002). Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* 70, 3673–3680.

Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD (2010). Lipid-cytokinechemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* 33: 266–278.

Clayburgh DR, Shen L, Turner JR (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Laboratory Investigation*; 84,282–291.

Clyne B e Olshaker JS (1999). "The C-reactive protein". *The Journal of Emergency Medicine*. 17(6): 1019–25.

Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC (2009). Resposta imune a doenças une a doenças infecciosas ecciosas. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42(2): 127-42.

- Coleman JE (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;21:441-83.
- Collier B, Dossett LA, May AK, Diaz JJ (2008). Glucose control and the inflammatory response. *Nutr Clin Pract.* Feb;23(1):3-15.
- Cooke A, Zaccane P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW (2004). Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol.*;20:316-21 – in Machado PRL, Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções. *An bras Dermatol, Rio de Janeiro*, 79(6):647-664, nov/dez.
- Cordingley FT, Crawford GP (1986). *Giardia* infection causes vitamin B12 deficiency. *Aust N Z J Med.* Feb;16(1):78-9.
- Costa CA, Santos MV, Rocha MO, Mello RT e Bodan MMB (1988). Parasitoses intestinais em crianças da creche Lenor Franco (SESIMINAS Contagem, MG): diagnóstico e terapêutica. *Rev. Farm. e Bioq. UFMG*, v. 9, p.7-13.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG (2011). Host Parasite Interactions and Pathophysiology in *Giardia* Infections. *International Journal for Parasitology.* 41:925-933.
- Cotton JA, Bhargava A, Ferraz JG, Yates RM, Beck PL, Buret AG (2014). *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infect Immun.* Jul;82(7):2772-87.
- Cotton JA, Motta JP, Schenck LP, Hirota SA, Beck PL e Buret AG (2014). *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PLoS One*, 9 (10): 109087.
- Cury GC, Salles PGO, Reis MCW, Rego VM, Arndt AW, SouzaFilho CBA, Moreira HB, Abreu MS e Leite PMG (1994). Prevalência da esquistossomose mansoni e de parasitoses intestinais em escolares da área rural do Município de Jaboticatubas, MG, 1992-1993. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, p. 217-220.
- Das S, Stevens T, Castillo C, Villasenor A, Arredondo H, Reddy K (2002). Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol.*, 32:655-57.
- De Carli GA, Candia EF (1992). Prevalência de geohelminthos entre escolares residentes nas vilas periféricas de Porto Alegre, RS. *Rev Bras Farm.*; 73(1):7-8.
- De Carli GA, Tasca T, Machado ARL (2006). Parasitoses Intestinais. In: Duncan BB, Schmidt MI, Giugliani ERJ, *Medicina Ambulatorial: condutas e atenção primária*

- baseadas em evidências. 3ª edição, Artmed, Porto Alegre, RS; Capítulo 160:1465-1475.
- De Magistris L, Secondulfo M, Sapone A, Carratù R, Iafusco D, Prisco F, Generoso M, Carteni M, Mezzogiorno A, Esposito V (2003). Infection with *Giardia* and intestinal permeability in humans. *Gastroenterology* 125, 277–279.
- De Vizia B, Poggi V, Vajro P, Cucchiara S, Acampora A (1985). Iron malabsorption in giardiasis. *J Pediatr.* Jul;107(1):75-8.
- Diamond LS, Harlow DR e Cunnick CC (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72(4):431-432.
- Djoumessi S (1989). Serum lipids and lipoproteins during malaria infection. *Pathol Biol* 1989, 37:909-11.
- Dos Santos JI e Vituri Cde L (1996). Some hematimetric findings in human *Giardia lamblia* infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Mar-Apr;38(2):91-5.
- Dreesen L, Rinaldi M, Chiers K, Li R, Geurden T, Van den Broeck W, Goddeeris B, Vercruyssen J, Claerebout E, Geldhof P (2012). Microarray analysis of the intestinal host response in *Giardia duodenalis* assemblage E infected calves. *PLoS One*; 7: e40985.
- Eckmann L (2003). Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.*; 25: 259–270.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD (2000). Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumendwelling pathogen *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology*, 164; 1478–1487.
- Edwards MR, Gilroy FV, Jimenez BM e O`Sullivan WJ (1989). Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 37, p. 19-26.
- Ekdahl K e Andersson Y (2005). Imported Giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 825–830.
- Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology* 33;3–28.
- Epstein FH, Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England journal of medicine*; 340: 448-54.
- Farthin MJG (1992). New perspectives in giardiasis. *J. Med. Microbiol.* - Vol. 37 (1992), 1-2.

- Farthing MJG (1997). The molecular pathogenesis of Giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24, 79–88.
- Farthing MJG (1989). Host parasite interactions in human Giardiasis. *Quart. J. Med.*, v. 70, p. 191-204.
- Faubert G (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 35–54.
- Faucher JF, Milama EN, Missinou MA, Ngomo R, Kombila M, Kreamsner PG (2002). The impact of malaria on common lipid parameters. *Parasitol Res.*, 88:1040-43.
- Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (2008). *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. New York: McGraw Hill; 1311-1315.
- Feng Y e Xiao L (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.*; 24:110–140.
- Ferreira H, Lala ERP, Monteiro MC, Raimondo ML (2006). Estudo Epidemiológico Localizado da frequência e fatores de risco para enteroparasitoses e sua correlação com o estado nutricional de crianças em idade pré-escolar. *Rev. Univ. Est. Ponta Grossa: Ciências Biológicas e da Saúde*, Ponta Grossa; 12(4):33-40.
- Ferreira LM, Ferreira LRK (2003). Experimental model: historic and conceptual revision. *Acta Cir Bras.*;18:1-3.
- Ferreira LM, Hochman B; Barbosa MVJ (2005). Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir. Bras.* vol.20; suppl.2; São Paulo.
- Field FJ, Kam NTP, Mathur SN (1990). Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterology*, 99:539-51.
- Finkelman FD, Katona IM, Urban JF, Holmes J, Ohara J, Tung AS, Sample JV e Paul WE (1988). IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J. Immunol.* 141:2335–2341.
- Fisher BS, Estrano CE, Cole JA (2013). Modeling long-term host cell-*Giardia lamblia* interactions in an in vitro co-culture system. *PLoS One* 8: e81104.
- Flanagan, PA (1992). *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* 109, 1–22.
- Fournier BM e Parkos CA (2012). The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 5: 354–366.
- Franzén O, Jerlström-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D,



- Andersson JO, Andersson B, Svärd SG (2009). Draft Genome Sequencing of *Giardia intestinalis* Assemblage B Isolate GS: Is Human Giardiasis Caused by Two Different Species? PLoS Pathogens.v5(8).
- Gaffen SL (2008). An Overview of IL-17 Function and Signaling. Cytokine. Sep; 43(3): 402–407.
- Gardner TB e Hill DR (2001). Treatment of Giardiasis. Division of Infectious Diseases, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut. Clin. Microbiol. Rev., v. 14, p. 114-128.
- Gargouri ML (1967). Utilisation du cholesterol dans l'amibiase experimental du cobaye. Ann parasitol Hum Comp., 42:399.
- Gascon J (2006). Epidemiology, etiology, and pathophysiology of traveler's diarrhea. Digestion; 73(Suppl):102–8.
- Gendrel D, Treluyer JM, Richard-Lenoble D (2003). Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. Fundamental and Clinical Pharmacology; 17(2):189–197.
- Gheorghescu B, Gherman I, Jovin GH, Suseanu I, Mercuriev E, Nedea M, Aposteanu G (1976). Absorption studies in patients with parasitic infestation of the small intestine, before and after treatment. Med Interne. Jan-Mar;14(1):31-8.
- Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu. Rev. Microbiol. 50:679–705.
- Goldin AJ, Werner APT, Aguilera X, Zulantay I, Warhurst DC e Milles MA (1990). Efficient diagnosis of Giardiasis among nursery and primary school children in Santiago, Chile by capture ELISA for the detection of fecal *Giardia* antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 42, p. 538-545.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun.;71:1185-93.
- Gomes MA, de Oliveira DR, de Freitas SE, de Pinho Viana M, Borges EL (2012). Effect of Giardiasis combined with low-protein diet on intestinal absorption of glucose and electrolytes in gerbils. Exp Parasitol. Aug;131(4):448-51.
- Gonçalves ALR, Belizário TL, Pimentel JB, Penatti MPA, Reginaldo dos Santos Pedroso RS (2011). Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v44, n2, Uberaba. Mar/Apr. Epub – Apr 29.

- Gordis L (2000). Epidemiology (2<sup>a</sup> ed). Saunders Company. Phyladelphia.
- Goyal N e Shukla G (2013). Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis* infected BALB/c mice. Dig Dis Sci; 58: 1218–1225.
- Goyal N, Rishi P e Shukla G (2013). Lactobacillus rhamnosus GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. World J Microbiol Biotechnol; 29:1049–1057.
- Grit GH, Devriendt B, Van Coppernolle S, Geurden T, Hope J, Vercruysse J, Cox E, Geldhof P, Claerebout E (2014). *Giardia duodenalis* stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation. Parasite Immunol.; 36: 157–169.
- Grit GH, 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* infection in cattle. Vet Parasitol.; 202: 145–155.
- Guimarães S e Sogayar MIL (1995). Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo, v. 37, p. 501-506.
- Gupta RS, Dixit VP, Dobhal MP (2002). Hypocholesterolaemic effect of the oleoresin of *Capsicum annum* L. in gerbils (*Meriones hurrianae* Jerdon). Phytother Res.; 16(3):273-5.
- Guyton AC e Hall JE (2006). Tratado de Fisiologia Médica. Elsevier - RJ. 11 ed., pp.808-18.
- Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Morch K, Coll P, Helgeland L, Langeland N (2007). Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. J. Infect. 55, 524–530.
- Haque R, Mondal D, Karim A, Molla IH, Rahim A, Faruque AS, Ahmad N, Kirkpatrick BD, Haupt E, Snider C, Petri Jr WA (2009). Prospective casecontrol study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. Clin. Infect. Dis. 48, 1191–1197.
- Hardin JA, Buret AG, Olson ME, Kimm MH, Gall DG (1997). Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of Giardiasis. J. Parasitol. 83, 908–912.
- Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water

and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6), 3163 - 3170.

- Haskill S, Peace A, Morris J, Sporn SA, Anisowicz A, Lee SW, Smith T, Martin G, Ralph P, Sager R (1990). Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**(19): 7732–6.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*;8(2):R19.
- Hernández-Sánchez J, Liñan RF, M del R Salinas-Tobón, Ortega-Pierres G (2008). *Giardia duodenalis*: Adhesion-deficient clones have reduced ability to establish infection in Mongolian gerbils. *Experimental Parasitology*, 119, 364–372.
- Heyworth MF, Carlson JR, Ermak TH (1987). Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 165, 1743–1748.
- Heyworth MF, Vergara JA (1994). *Giardia muris* trophozoite antigenic targets for mouse intestinal IgA antibody. *Journal of Infectious Diseases*, 169, 395–398.
- Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M (2004). Experimental model in hamsters (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cir Bras* [serial on the Internet]. [cited 2005 Aug 29];19. Available from URL: <http://www.scielo.br/acb.2004>
- Hollm-Delgado MG, Gilman RH, Bern C, Cabrera L, Sterling CR, Black RE, Checkley W. (2008). Lack of an adverse effect of *Giardia intestinalis* infection on the health of Peruvian children. *Am. J. Epidemiol.* 168, 647–655.
- Hopkins RN, Meloni BP, Groth DM, Reynoldson JA, Thompson RCA (1997). Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *Journal of Parasitology*, Lancaster, v.83, n.1, p.44-51.
- Hörman A, Korpela H, Sutinen J, Wedel H, Hänninen ML (2004). Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *Int J Parasitol*, 34(12):1337-46.
- Huang XJ, Choi YK, IM HS, Yarimaga O, Yoon E e Kim HS (2006). Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel)*. Jul; 6(7): 756–782.
- Humen MA, De Antoni GL, Benyacoub J, Costas ME, Cardozo MI, Kozubsky L, Saudan

- KY, Boenzli-Bruand A, Blum S, Schiffrin EJ, Pérez PF (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infect. Immun.* 73, 1265–1269.
- Inpankaew T, Jiyipong T, Thadtapong N, Kengradomkij C, Pinyopanuwat N, Chimnoi W, Jittapalapong S (2015). Prevalence and genotype of *Giardia duodenalis* in dairy cattle from Northern and Northeastern part of Thailand. *Acta Parasitol. Sep* 1;60(3):459-61.
- Jacobsen EA, Helmers RA, Lee JJ e Lee NA (2012). The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. *Blood*; 120:3882–3890.
- Janeway CA Jr (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.*;3:1167-71.
- Janeway CA Jr, Travers P e Walport M (2008). In *Janeway's Immunobiology*. New York, Garland Science, 1–887.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005) *ImmunoBiology*, Sixth Edition. New York: Garland Science Taylor and Francis Group.
- Jarrol EL, Muller PJ, Meyer EA, Morse SA (1981). Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.*, 2:187-96.
- Jenkins MC, O'Brien CN, Murphy C, Schwarz R, Miska K, Rosenthal B, Trout JM (2009). Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent in vitro binding of *Giardia lamblia* trophozoites. *J. Parasitol.* 95, 895–899.
- Jimenez-Cardoso E, Eligio-Garcia L, Cortes-Campos A, Flores-Luna A, Valencia-Mayoral P, Lozada-Chavez I (2009). Changes in beta-giardin sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains. *Parasitol. Res.* 105, 25–33.
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E e Kagnoff MF. (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95, 55–65.
- Kamda JD e Singer SM (2009). Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun.*; 77: 685–693.
- Kamda JD, Nash TE e Singer SM (2012). *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol.*;130: 288–291.
- Kamda JD, Nash TE, Singer SM (2012). *Giardia duodenalis*: Dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Experimental Parasitology*, 130, 288–291.

- Kaneda Y, Goutsu T (1985). Lipid analysis of *Giardia lamblia* and its culture medium. *Ann Trop Med Parasitol* 1985, 82:83-90.
- Karpovich N, Chobotova K, Carver J, Heath JK, Barlow DH, Mardon HJ (2003). Expression and function of interleukin-11 and its receptor alpha in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*. Feb;9(2):75-80.
- Keister DB (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;77(4):487-8.
- Khader SA, Gaffen SL e Kolls JK (2009). Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.*; 2:403–411.
- Kimura A, Naka T e Kishimoto T (2007). IL-6- dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104: 12099–12104.
- Koh WH, Geurden T, Paget T, O'Handley R, Steuart RF, Thompson RC, Buret AG (2013). *Giardia duodenalis* assemblage-specific induction of apoptosis and tight junction disruption in human intestinal epithelial cells: effects of mixed infections. *J Parasitol*. 2013 Apr;99(2):353-8.
- Kolaczowska E e Kubes P (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159–175.
- Kool BGP, Kate FJW, Juffrie M, Rosalina I, Tamianiau JJAM, Benninga MA (2009). Does *Giardia lamblia* Causes Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr*, 49(3):304-308.
- Korkes F, Kumagai FU, Belfort RN, Szejnfeld D, Abud TG, Kleinman A, Florez GM, Szejnfeld T, Chieffi PP (2009). Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in an urban slum. *J Trop Pediatr*, 55(1): 42-45.
- Koruk I, Simsek Z, Tekin Koruk S, Doni N, Gürses G (2010). Intestinal parasites, nutritional status and psychomotor development delay in migratory farm worker's children. *Child Care Health Dev*; 36: 888-894.
- Kostman R (1975). Infantile genetic agranulocytosis. A review with presentation of ten new cases. *Acta Paediatr Scand* 64: 362–368.
- Kralisz M, Matowicka-Karna J (2008). Evaluation of morphological parameters of blood platelets in the course of giardiasis. *Pol Merkur Lekarski.*;25(150):480-3.

- Kuijpers T e Lutter R (2012). Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin. *Cell Mol Life Sci* 69: 7–15.
- Kulda J e Noýnková E (1996). *Giardia* in humans and animals. In J. P. Kreier (ed.), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., v. 10, p. 225-422. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Lane S e 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. *Infection and Immunity*, 70, 11–18.
- Larocque R, Nakagaki K, Lee P, Abdul-Wahid A e Faubert GM (2003). Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun.*; 71:5662–5669.
- Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 40: 1063-1074.
- Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC, Wilkes L. e Danzinger LH (1992). Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin. Pharmacokinet*, v. 23, p. 328-364.
- Lauwaet T, Davis BJ, Reiner DS, Gillin FD (2007). Encystation of *G. lamblia*: A model for other parasites. *Curr Opin Microbiol*, 10(6):554-559.
- 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-kappaB and AP-1. *Parasite Immunol* 34: 183–198.
- Leitch G.J, Udezulu IA, He Q, Visvesvara GS (1993). Effects of protein malnutrition on experimental Giardiasis in the Mongolian gerbil. *Scand. J. Gastroenterol.* 28, 885–893.
- Leite MAG (2015). Ancestralidade genômica como fator predisponente para a amebíase invasiva. Belo Horizonte – MG. 80 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte – 2015.
- Letterio JJ e Roberts AB (1998). Regulation of immuneresponses by TGF- $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.* 16:137–61.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation:

- the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678–689.
- Li E, Zhou P, Petrin Z e Singer SM (2004). Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.*; 72:6642–6649.
- Linstead D (1981). New defined and semi-defined media for cultivation of the flagellate *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, 81:125-37.
- Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H e Velazquez C (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*, 2015, 37(8), 394–406.
- Luján HD e Svärd S (2011). *Giardia* A Model Organism. Austria, Springer Wein New-York: 1–417.
- Luján HD, Mowatt MR e Nash TE (1998). The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitol Today* 1998; 14: 446–450.
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE (1997). The mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 61:294-304.
- Luján HD, Nowatt MR, Byrd LG, Nash TE (1996). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:7628-7633.
- Maaser C e Kagnoff MF (2002). Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Z. Gastroenterol.* 40, 525–529.
- Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM (2004). Immune response mechanisms to infections. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell (2010). Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 4320p.
- Mason PR, Patterson BA (1987). Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 277–282.
- Massena S, Christoffersson G, Hjertstrom E, Zcharia E, Vlodaysky I, Ausmees N, Rolny C, Li JP, Phillipson M (2010). A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116: 1924–1931.
- Matowicka-Karna J, Kralisz M e Kemonia H (2011). Assessment of the levels of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN-gamma) in giardiasis. *Folia Histochem Cytobiol*; 49: 280–284.

- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB (1995). Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblage by eletrophoretic analysis of anzymes encored at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology, London, v.111, p.11-17.
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. Science 330: 362–366.
- McFarland L (2000). Normal flora: diversity and function. Microb. Ecol. Health Dis. 12, 193–207.
- Meeusen EN e Balic A (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? Parasitol Today;16(3):95–101.
- Mei J, Liu Y, Dai N, Hoffmann C, Hudock KM, Zhang P, Guttentag SH, Kolls JK, Oliver PM, Bushman FD, Worthen GS (2012). Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. J Clin Invest 122: 974–986.
- Melo MCB, Klem VGQ, Mota JAC, Penna FJ (2004). Parasitoses intestinais. Revista Médica de Minas Gerais; 14(1):3-12.
- Mendis AH, Thompson RC, Reynoldson JA, Armson A, Meloni BP e Gunsberg S (1992). The uptake and conversion of L-[U14C-] aspartato and L-[U14C-] alanine to 14CO2 by intact trophozoites of *Giardia duodenalis*. Comp. Biochem. Physiol. Ser., v. B 102, p. 235-239.
- Menezes AL, Lima VM, Freitas MT, Rocha MO, Silva EF, Dolabella SS (2008). Prevalence of intestinal parasites in children from public daycare centers in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 50(1): 57-59.
- Meyer EA e Radulescu S (1979). *Giardia* e Giardiasis. Adv. Parasitol., v17, p. 1-47.
- Mills KH, McGuirk P (2004). Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. Semin Immunol.;16:107-17.
- Minetti C, Lamden K, Durband C, Cheesbrough J, Fox A, Wastling JM (2015). Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic Giardiasis from England. Parasit Vectors. Sep 4;8:444.
- Mitcham C, Ed. (2005) Encyclopedia of Science, Technology, and Ethics. Detroit: Macmillan Reference. 2378 pp. 4 vols.
- Mokrzycka M, Kolasa A, Kosierkiewicz A e Wiszniewska B (2010). Inducible nitric oxide



synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. *Folia Histochem Cytobiol.*; 48: 191–196.

- Monajemzadeh SM, Monajemzadeh M (2008). Comparison of iron and hematological indices in *Giardia lamblia* infection before and after treatment in 102 children in Ahwaz, Iran. *Med Sci Monit*, 14 (1): 19-23.
- Mondal D, Haque R, Sack RB, Kirkpatrick BD, Petri WA Jr (2009). Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 80(5):824–826.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect Genet Evol* 3: 29-38.
- Moreno AC, Filho AF, Gomes TA, Ramos ST, Montemor LP, Tavares VC, Filho LS, Irino K, Martinez MB (2010). Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66(1): 50-57.
- Morken MH, Valeur J, Norin E, Midtvedt T, Nysaeter G, Berstad A (2009). Antibiotic or bacterial therapy in post-Giardiasis irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* 44, 1296–1303.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 317, 1921–1926.
- Mosmann TR, Coffman RL (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.*:145-73.
- Müeller N, von Allmen N (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*; 35:1339–47.
- Mukhopadhyay C, Wilson G, Pradhan D, Shivananda PG (2007). Intestinal protozoal infestation profile in persistent diarrhea in children below age 5 years in western Nepal. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*; 38(1):13–19.
- Naik SR, Mohanty D, Rau NR, Vinayak VK (1982). Haematological profile in patients with *Giardia lamblia* infection. *Ann Trop Med Parasitol*, 76: 83-8.

- Nash TE; Herrington DA; Losonsky GA; Levine MM (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J. Infect. Dis. 156, 974–984.
- Neres-Norberg A, Guerra-Sanches F, Moreira-Norberg PRB, Madeira-Oliveira JT, Santa-Helena AA, Serra-Freire NM (2014). Intestinal Parasitism in Terena Indigenous People of the Province of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Salud Pública. v16; n.6. Bogotá. Nov./Dec.
- Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA (2011). Parasitologia Humana. 11<sup>a</sup> ed. Atheneu São Paulo, 494 p.
- Nilson EI, Nilson EP (1990). Changes in plasma lipoproteins in acute malaria. J Intern Med., 227:151-55.
- Nohria A, Alonso RA, Peattie DA (1992). Identification and characterization of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 56, 27–37.
- O’Handley RM, Buret AG, McAllister TA, Jelinski M e Olson ME (2001). Giardiasis in dairy calves: effects of fenbendazole treatment on intestinal structure and function. Int. J. Parasitol. 31, 73–79.
- Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Rodríguez G e Clavel A (2003). Serum mineral levels in children with intestinal parasitic infection. v21, Issue 3, p 258-261.
- Oliveira D, Ferreira FS, Atouguia J, Fortes F, Guerra A, Centeno-Lima S (2015). Infection by Intestinal Parasites, Stunting and Anemia in School-Aged Children from Southern Angola. PLoS One. Sep 15;10(9).
- Oliveira FMS, Horta BC, Prata LO, Santiago AF, Alves AC, Faria AMC, Gomes MA, Caliarí MV (2012). Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. Infect Dis Rep. Apr 27; 4(2): e27.
- Olmez S, Aslan M, Yavuz A, Bulut G, Dulger AC (2014). Diffuse nodular lymphoid hyperplasia of the small bowel associated with common variable immunodeficiency and Giardiasis: a rare case report. Wiener klinische Wochenschrift, 126, 294–297.
- Onongbu IC, Onyeneke EC (1983). Plasma lipid changes in human malaria. Tropenmed Parasitol., 34:193-96.
- Paget TA, Kelly ML, Jarrol EL, Lindmark DG e Lloyd D (1993). The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol., v. 57, p. 65-71.

- Paget TA, Raynor MH, Shipp DW e Lloyd D (1990). *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. Mol. Biochem. Parasitol., v. 42, p. 63-67.
- Painter JE, Gargano JW, Collier SA e Yoder JS (2015). Giardiasis surveillance – United States, 2011–2012. MMWR Surveill Summ; 64: 15–25.
- Palm D, Weiland M, McArthur AG Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder F, Svard S (2005). Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. Mol Biochem Parasitol, 141:199-207.
- Peattie DA (1990). The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. Parasitol. Today 6, 52–56.
- Peattie DA, Alonso RA, Hein A, Caulfield JP (1989). Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. J. Cell Biol. 109, 2323–2335.
- Pickering LK (2005). Giardíase e balantidiose. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Nelson G. Tratado de Pediatria. 17ª edição. Rio de Janeiro, Editora Elsevier.
- Piva B e Benchimol M (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. Biol Cell, 96: 735-746.
- Prado MS, Cairncross S, Strina A, Barreto ML, Oliveira-Assis AM, Rego S (2005). Asymptomatic giardiasis and growth in young children; a longitudinal study in Salvador, Brazil. Parasitology. Jul;131(Pt 1):51-6.
- Quihui-Cota L, León-Trujillo R, Astiazarán-García H, Esparza-Romero J, del Refugio Robles M, Robles-Zepeda RE, Canett R, Sánchez-Escalante J (2014). Marked antiGiardial activity of *Yucca baccata* extracts: a potential natural alternative for treating protozoan infections. Biomed Res Int.;2014:823492.
- Rey L (2008). Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais. 4ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Reynoso-Robles R, Ponce-Macotela M, Rosas-López LE, Ramos-Morales A, Martínez-Gordillo MN e González-Maciela A (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an *in vivo* model. Sci Rep. 5.
- Rivero FD, Saura A, Prucca CG, Carranza PG, Torri A e Luján HD (2010). Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. Nat Med; 16: 551–557.
- Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Morch K, Langeland N (2010). Giardiasis—why do

the symptoms sometimes never stop? Trends Parasitol. 26, 75–82.

Rosenberg HF, Dyer KD e Foster PS (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. Nat Rev Immunol; 13: 9–22.

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

Roxstrom-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E e Svard SG (2006). *Giardia* immunity – an update. Trends Parasitol 2006; 22: 26–31.

Roy S.K, Buis M, Weersma R, Khatun WS, Chowdhury S, Begum A, Sarker D, I Thakur SK , Khanam M (2011). Risk factors of mortality in severely-malnourished children hospitalized with diarrhoea. Journal of Health, Population and Nutrition; 29(3):229-235.

Rubin W, Ross LL, Sleisenger MH, Weser E (1996). An electron microscopic study of adult celiac disease. Lab Invest;15:1720–47.

Sampaio IBM (2010). Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3ª ed. 264p.

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

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

Schantz PM (1991). Parasitic zoonoses in perspective. Int. J. Parasitol., v. 21, p. 161-170, 1990 apud Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A. e Mendis, A.H.W. *Giardia* and Giardiasis. Adv. Parasitol., v. 32, p. 71-160.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D e Rose-John S (2011). The pro and anti inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta; 1813: 878–888.

Schofield PJ, Costello M, Edwards MR e O`Sullivan WJ (1990). The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. Int. J. Parasitol., v. 20, p. 697-699.

Schofield PJ, Edwards MR, Matthews J, Wilson JR (1992). The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. Molecular and Biochemical Parasitology, 51, 29–36.

Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK (2000). Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. J Immunol 164: 4783–4789.

- Scott KGE, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA e Buret AG (2000). Jejunal brush border microvillous alterations in *G. muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun*; 68:3412–18.
- Scott KGE, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG (2002). Intestinal infection with *Giardia* spp. Reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123, 1179–1190.
- Scott KGE, Yu LC, Buret AG (2004). Role of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine Giardiasis. *Infect. Immun.* 72, 3536–3542.
- Sedinova J, Flegr J, EY PL, Kulda J (2003). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the identification of *Giardia intestinalis* subtypes and phylogenetic tree construction. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50(3), p198-203.
- 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.
- Sharma R (1959). Effect of cholesterol on the growth and virulence of *E. histolytica*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.*, 53:278.
- Shin JC, Reyes AW, Kim SH, Kim S, Park HJ, Seo KW, Song KH (2015). Molecular Detection of *Giardia intestinalis* from Stray Dogs in Animal Shelters of Gyeongsangbuk-do (Province) and Daejeon, Korea. *Korean J Parasitol.* Aug;53(4):477-81.
- Shukla G, Sidhu RK e Verma A (2012). Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 102:61–72.
- Simons K, Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 1:31-9.
- Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM e Ward LD (1997). Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.* May; 6(5): 929–955.
- Simsek Z, Zeyrek FY, Kurcer MA (2004). Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0-5 years. *J Trop Pediatr*; 50: 90-93.
- Singer SM e Nash TE (2000a). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.*; 68: 170–175.
- Singer SM e Nash TE (2000b). The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J. Infect. Dis.* 181, 1510–1512.

- Singer SM (2016). Control of Giardiasis by Interleukin-17 in Humans and Mice - Are the Questions All Answered? *Clin Vaccine Immunol.* Nov 18;23(1):2-5.
- Siwila J, Phiri IG, Enemark HL, Nchito M, Olsen A (2010). Intestinal helminthes and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 122–128.
- Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE (1981). IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterology*, 80, 1476–1480.
- Solari AJ, Rahn MI, Saura A, Luján HD (2003). A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell*, 27:329-346.
- Solaymani-Mohammadi S e Singer SM (2010). *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in Giardiasis. *Exp Parasitol*; 126: 292–297.
- Solaymani-Mohammadi S e Singer SM (2011). Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J Immunol.*; 187: 3769–3775.
- Sonda S, Ting LM, Novak S, Kim K, Maher JJ, Farese RV, Ernst JD (2001). Cholesterol esterification by host and parasite is essential for optimal proliferation of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.*, 276:34434-40.
- Sprong H, Caccio SM e van der Giessen JW (2009). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.*; 3: e558.
- Stadelmann B, Hanevik K, Andersson MK, Bruserud O, Svärd SG (2013). The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia*-host cell interactions in vitro. *BMC Microbiology*, 13, 256.
- Stadelmann B, Merino MC, Persson L, Svärd SG (2012). Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*, 7(9), e45325.
- Stojecki K, Sroka J, Caccio SM, Cencek T, Dutkiewicz J, Kusyk P (2015). Prevalence and molecular typing of *Giardia duodenalis* in wildlife from eastern Poland. *Folia Parasitol (Praha)*;62.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318–324.
- Szabady RL e McCormick BA (2013). Control of neutrophil inflammation at mucosal

surfaces by secreted epithelial products. *Front Immunol* 4: 220.

- Tako EA, Hassimi MF, Li E e Singer SM (2013). Transcriptomic analysis of the host response to *Giardia duodenalis* infection reveals redundant mechanisms for parasite control. *MBio*; 4: e00660–e00613.
- Tashima NT, Simões MJ, Leite CQ, Fluminhan A, Nogueira MA, Malaspina AC (2009). Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 51(1): 19-24.
- Tejman-Yarden N, Miyamoto Y, Leitsch D, Santini J, Debnath A, Gut J, McKerrow JH, Reed SL, Eckmann L (2013). A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother*. May;57(5):2029-35.
- 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 resistance. *J. Parasitol.* 86, 800–806.
- The Medical Letter (2010). *Drugs for Parasitic Infections*.
- Thompson RCA e Monis PT (2004). Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*. 58, 69-137.
- Thompson RCA (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.*, 30:1259-1267.
- Thompson RCA, Hopkins RN, Homan WL (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today, Amsterdam*, v.16, n.5,p.211-213.
- Thompson RCA, Lymbery AJ, Meloni BP (1990). Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1982: Taxonomic and apidemiological significance. *Protozoological Abstracts*, Farnham Royal, v14, p.1-28.
- Thompson RCA, Reynoldson JA e Mendis AHW (1993). *Giardia* and Giardiasis. *Adv. Parasitol.*, v. 32, p. 71-160.
- Thomson ABR, Schoeller C, Keelan M, Smith L, Clandinin MT (1993). Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush border membrane and beyond. *Can J Physiol Pharmacol.*, 71:531-55.
- Torgerson PR, Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Willingham AL, Kasuga F, Rokni MB, Zhou XN, Fèvre EM, Sripa B, Gargouri N, Fürst T, Budke CM, Carabin H, Kirk MD, Angulo FJ, Havelaar A e Silva N (2015). World Health Organization

Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. PLoS Med. Dec; 12(12).

Torres DMAGV, Chiffi PP, Costa WA e Kudzielics E (1991). Giardíase em creches mantidas pela Prefeitura do Município de São Paulo, 1982/1983. Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo, v. 33, p.137-142.

Townson SM, Upcroft JA e Upcroft P (1996). Characterisation and purification of piruvate ferredoxin oxireductase from *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol., v. 79, p. 183-193.

Tracy JW e Webster LT (1996). Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In J. G. Hardman and L. E. Limbird(ed.), The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y., p. 987-1008.

Troeger H, Epple H-J, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut;56:328–35.

Turner JR (2006). Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation - From Basic Mechanisms to Clinical Application. Am J Pathol. Dec; 169(6):1901–1909.

Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nature Reviews Immunology 9:799-809.

Ungar BLP, Yolken RH, Nash TE e Quinn TC (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. Journal of Infectious Diseases, v. 149, p. 90-97.

Valverde JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ, Leles De Souza D, Jaeger LH, Martins PP, Meneses VF, Bóia MN, Carvalho-Costa FA (2011). Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. Ann Trop Med Parasitol. Sep;105(6):413-24.

Velazquez C, Beltran M, Ontiveros N, et al. (2005). *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. Parasite Immunol; 27: 351–356.

Venkatesan P, Finch RG, Wakelin D (1997). A comparison of mucosal inflammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice. Parasite Immunol. 19, 137–143.

Ventura LLA (2013). Impacto da desnutrição sobre o metabolismo e o desenvolvimento de alterações histopatológicas no intestino delgado de Gerbils (*Meriones unguiculatus*)



experimentalmente infectados com *Giardia lamblia*. Belo Horizonte: MG. 78p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Parasitologia. Instituto de Ciência Biológicas – Univ. Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Ventura LLA, Oliveira DR, Viana JC, Santos JF, Caliari MV, Gomes MA (2013). Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol.* Apr;133(4):391-5.

Ventura-Juarez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, Pineda-Vazquez A, Munoz-Fernandez L, Madrid-Reyes JI, Campos-Rodriguez R (2003). Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol*;25:503-11.

Visvesvara GS, Dickerson JW, Healy GR (1988). Variable Infectivity of Human-Derived *Giardia lamblia* Cysts for Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Clinical Microbiology.* Vol 26. nº5. p. 837-841.

Ward HD (2009). Intestinal protozoal parasites and diarrheal disease in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1198–1200.

Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oct;14(5):361-8.

Weatherall DJ (2010). "Chapter 47. The Thalassemias: Disorders of Globin Synthesis" (Chapter). In: \_\_\_\_\_ Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal, JT: *Williams Hematology*, 8ed:

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

WHO - World Health Organization (2005). Report of the third global meeting of the partners for parasite control: Deworming for Health and Development. Geneva. 53 pp.

Wilcox G (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem. Review.* Vol 26. p.19-39.

Wright JM, Dunn LA, Upcroft P e Upcroft J (2003). A. Efficacy of antiGiardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.*, v. 2(6), p. 529-541.

Yoshimura A e Muto G (2011). TGF- $\beta$  function in immune suppression. *Curr Top Microbiol Immunol.*;350:127-47.

Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L (2002). How protozoan

parasites evade the immune response. Trends Parasitol.;18:272-8.

Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K (2009). Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. Br J Haematol 144: 459–467.

Zenian AJ e Gillin FD (1985) Interactions of *Giardia lamblia* with human intestinal mucus: enhancement of trophozoite attachment to glass. J Protozool 32(4):664-668.

Zhang JM e An J (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. Int Anesthesiol Clin. Spring; 45(2): 27–37.

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

Zhou P, Li E, Zhu N, Robertson J, Nash T e Singer SM (2003). Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. Infect Immun.;71: 1566–1568.

Zinneman HH e Kaplan AP (1972). The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. Am J Dig Dis. Sep;17(9):793-7.

## **8. ANEXOS**

# Anexo 1

## Carta da “Comissão de ética no uso de animais - CEUA” Protocolo 342/2015



UFMG

### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 342 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Perfil Bioquímico e Imunológico de gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados por *Giardia lamblia*.”, que tem como responsável Maria Aparecida Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/02/2016. Este certificado espira-se em 23/02/2021.

#### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 342 / 2015, related to the Project entitled “Biochemical and immune profile of gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected with *Giardia lamblia*”, under the supervision of Maria Aparecida Gomes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/02/2016. This certificates expires in 23/02/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 23/02/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## **Anexo 2**

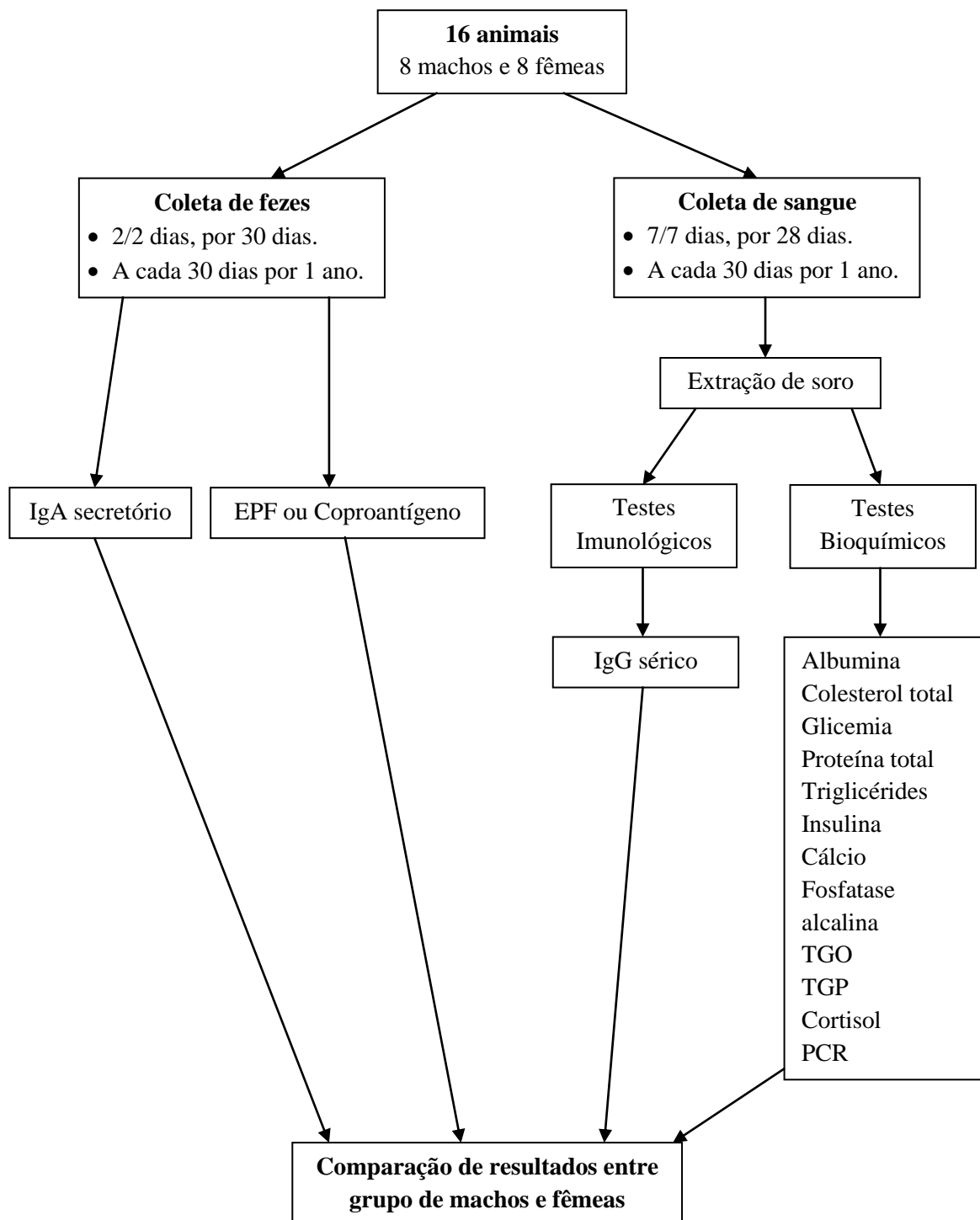
**POP – Procedimento Operacional Padrão**

**(LAPI- ICB/UFMG)**

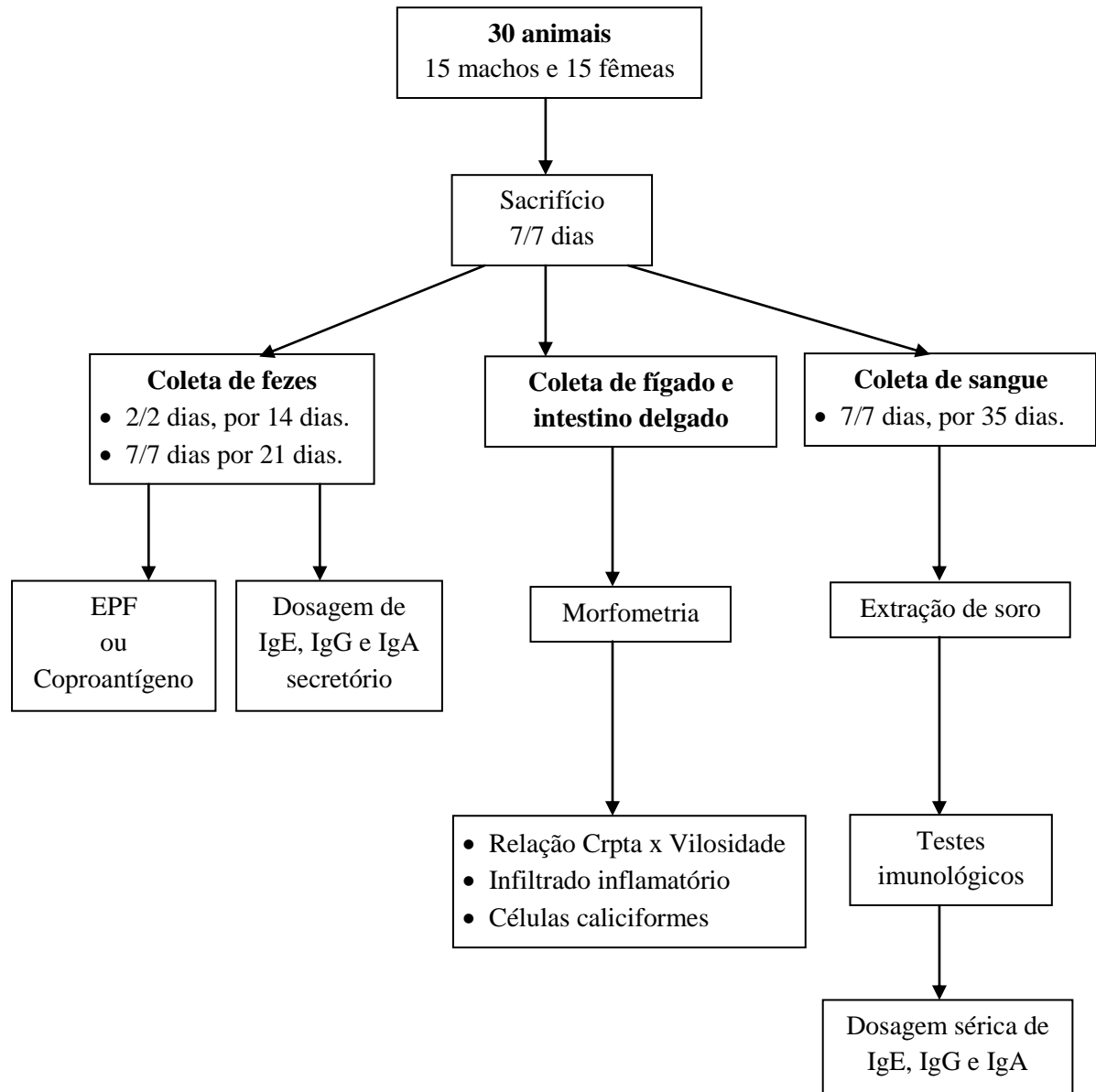
# Anexo 3

## Delineamento Experimental

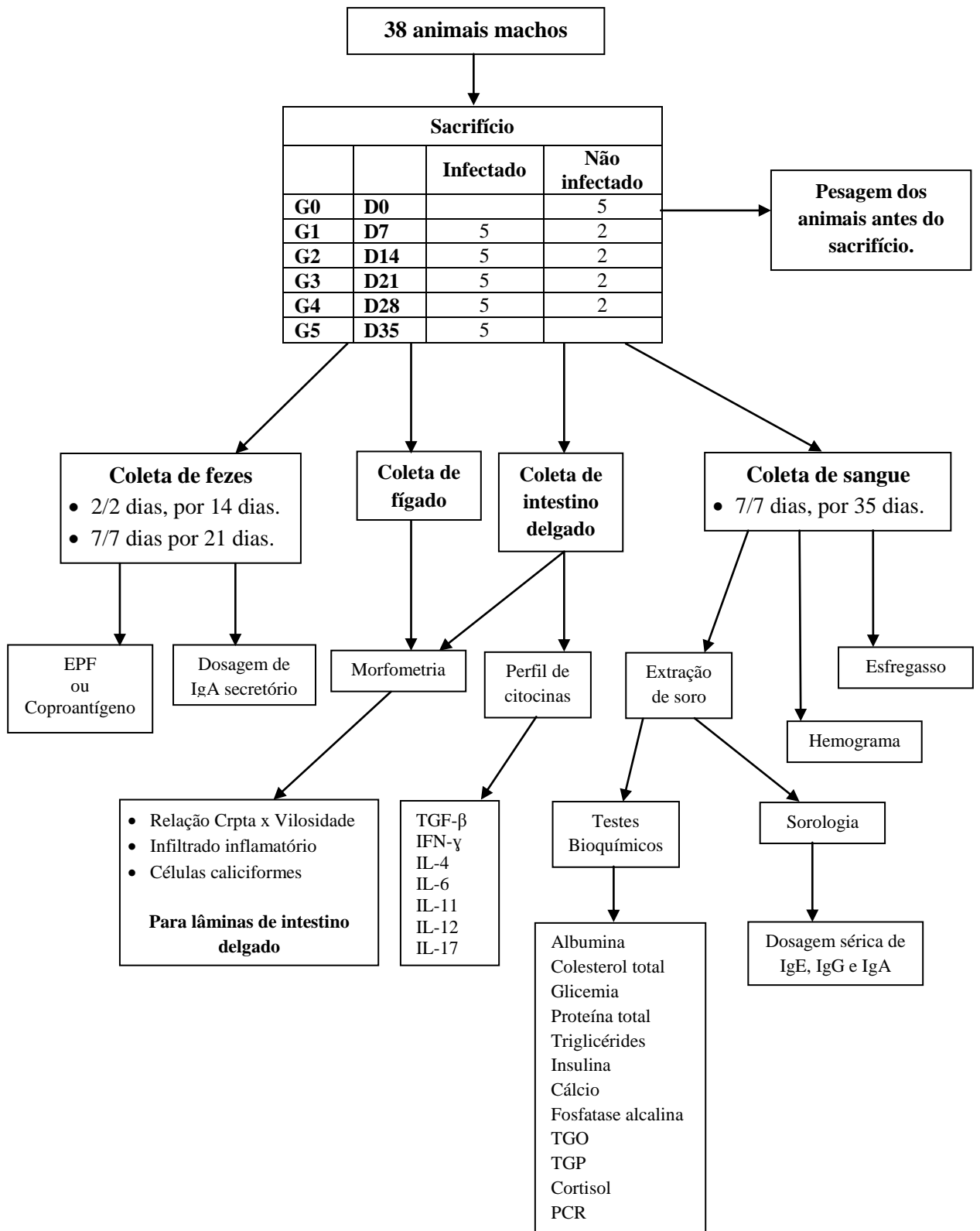
### 1ª Fase



## 2ª Fase



### 3ª Fase





## Anexo 4

Tabela 4 – Glicemia.

	SEXO				p
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
GLICEMIA_D0	55,35	6,39	37,49	3,38	0,027
GLICEMIA_D7	61,05	6,60	39,02	6,65	0,034
GLICEMIA_D14	29,40	4,30	21,21	3,38	0,157
GLICEMIA_D21	62,55	4,96	45,62	4,55	0,021
GLICEMIA_D28	75,24	4,52	66,57	3,00	0,132
GLICEMIA_D35	54,53	4,75	39,07	2,31	0,011

Tabela 5 – Proteínas totais.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
PROTEÍNAS_TOTAIS_D0	7,43	0,58	7,59	0,45	0,574
PROTEÍNAS_TOTAIS_D7	5,36	0,39	7,09	0,35	0,005
PROTEÍNAS_TOTAIS_D14	5,35	0,30	6,00	0,26	0,118
PROTEÍNAS_TOTAIS_D21	5,70	0,17	5,47	0,21	0,409
PROTEÍNAS_TOTAIS_D28	5,38	0,32	5,41	0,33	1,000
PROTEÍNAS_TOTAIS_D35	6,43	0,26	6,60	0,23	0,609

Tabela 6 – Albumina.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
ALBUMINA_D0	1,84	0,07	1,96	0,07	0,240
ALBUMINA_D7	2,38	0,11	2,86	0,11	0,008
ALBUMINA_D14	3,33	0,14	3,77	0,12	0,030
ALBUMINA_D21	3,33	0,14	3,77	0,12	0,030
ALBUMINA_D28	3,55	0,09	3,33	0,11	0,161
ALBUMINA_35	2,91	0,17	2,96	0,14	0,827

Tabela 7 – TGO / AST.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
TGO_D0	180,95	20,65	141,33	11,93	0,119
TGO_D7	106,54	9,97	113,49	11,28	0,652
TGO_D14	129,24	6,24	125,13	14,16	0,794
TGO_D21	119,01	11,86	105,54	6,67	0,339
TGO_D28	89,68	4,64	108,69	3,44	0,005
TGO_D35	85,14	5,71	90,70	5,65	0,500
TGO_D42	106,19	5,12	99,51	7,30	0,466
TGO_D49	89,95	4,57	88,44	6,72	0,852
TGO_D63	103,42	6,53	111,73	9,41	0,755

Tabela 8 – TGP / ALT.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
TGP_D0	55,52	4,82	43,55	3,87	0,073
TGP_D7	29,13	3,48	39,14	2,96	0,046
TGP_D14	63,43	5,95	60,31	4,90	0,092
TGP_D21	48,49	5,25	61,04	10,20	0,442
TGP_D28	44,47	3,10	37,35	4,21	0,195
TGP_D35	46,65	5,27	35,81	6,21	0,205
TGP_D42	50,46	4,99	39,63	3,04	0,130
TGP_D49	26,49	1,39	48,74	5,18	0,001
TGP_D63	53,28	5,47	64,55	8,36	0,345

Tabela 9 – Fosfatase alcalina.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
FOSFATASE_ALCALINA_D0	245,99	16,45	230,95	14,87	0,509
FOSFATASE_ALCALINA_D7	145,65	15,94	147,19	10,77	0,937
FOSFATASE_ALCALINA_D14	120,80	11,09	104,75	5,43	0,215
FOSFATASE_ALCALINA_D21	81,27	5,74	73,85	3,38	0,284
FOSFATASE_ALCALINA_D28	114,66	13,20	124,94	12,57	0,582
FOSFATASE_ALCALINA_D35	98,66	6,78	86,00	8,30	0,257
FOSFATASE_ALCALINA_D42	79,86	4,76	72,21	1,62	0,151
FOSFATASE_ALCALINA_D49	66,01	2,81	57,91	3,13	0,075
FOSFATASE_ALCALINA_D63	49,91	4,99	35,00	1,34	0,029

Tabela 10 – Colesterol total.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
COLESTEROL_TOTAL_D0	75,11	8,00	86,37	3,74	0,226
COLESTEROL_TOTAL_D7	61,05	4,27	67,37	4,99	0,352
COLESTEROL_TOTAL_D14	79,88	4,89	93,30	6,80	0,132
COLESTEROL_TOTAL_D21	110,74	7,58	100,50	8,50	0,384
COLESTEROL_TOTAL_D28	106,39	10,82	78,19	4,29	0,028
COLESTEROL_TOTAL_D35	79,18	3,74	70,20	3,65	0,100

Tabela 11 – Triglicérides.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
TRIGLICÉRIDES_D0	195,53	19,41	252,54	16,73	0,043
TRIGLICÉRIDES_D7	193,47	17,82	220,48	18,09	0,305
TRIGLICÉRIDES_D14	161,63	12,41	169,82	14,68	0,667
TRIGLICÉRIDES_D21	298,48	28,65	232,99	42,53	0,222
TRIGLICÉRIDES_D28	299,50	20,21	207,98	31,14	0,027
TRIGLICÉRIDES_D35	132,69	16,78	128,99	9,13	0,645

Tabela 12 – Insulina.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
INSULINA_D0	0,38	0,11	0,85	0,17	0,035
INSULINA_D7	0,88	0,13	2,08	0,12	< 0,001
INSULINA_D14	0,10	0,00	0,10	0,00	1,000
INSULINA_D21	1,73	0,38	1,70	0,17	0,953
INSULINA_D28	0,88	0,12	1,73	0,29	0,010
INSULINA_D35	0,48	0,16	0,53	0,10	0,799

Tabela 13 – Cortisol.

	SEXO				P
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
CORTISOL_D0	18,13	,62	10,08	2,26	0,021
CORTISOL_D7	23,90	1,01	20,50	1,69	0,161
CORTISOL_D14	29,83	1,53	23,75	1,75	< 0,001
CORTISOL_D21	14,33	1,90	17,58	2,95	0,721
CORTISOL_D28	18,85	2,46	29,85	1,17	0,002
CORTISOL_D35	22,18	1,41	21,47	0,92	0,442

Tabela 14 – Cálcio.

	SEXO				p
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
CÁLCIO_D0	6,25	0,59	6,01	0,49	0,758
CÁLCIO_D7	6,09	0,53	6,88	0,36	0,241
CÁLCIO_D14	10,59	0,75	10,29	0,72	0,773
CÁLCIO_D21	12,38	0,68	10,86	0,38	0,0763
CÁLCIO_D28	13,05	0,88	5,55	0,85	< 0,001
CÁLCIO_D35	5,30	0,97	3,34	0,74	0,130
CÁLCIO_D42	10,16	0,63	9,80	1,06	0,721
CÁLCIO_D49	11,14	0,83	8,30	0,73	0,025
CÁLCIO_D63	7,73	0,78	7,29	1,18	0,694

Tabela 15 – PCR.

	SEXO				p
	FÊMEA		MACHO		
	Média	DP	Média	DP	
PCR_D0	0,10	0,00	0,10	0,00	
PCR_D7	0,10	0,00	0,10	0,00	
PCR_D14	0,10	0,00	0,10	0,00	
PCR_D21	0,10	0,00	0,10	0,00	
PCR_D28	0,19	0,01	0,10	0,00	
PCR_D35	0,10	0,00	0,12	0,02	

## Anexo 5

### Valores de referência (*Meriones unguiculatus*)

Fonte: <http://www.geocities.ws/materialvet/clinica/dadossemiologicos.html>

Consulta em 19/09/2016

---

- Temperatura corporal: De 37 a 38,5 °C.
- Número de cromossomos: 44 em células diplóides e 22 em células haplóides.
- Consumo de alimento por dia: De 5 a 8 g/100 g.
- Consumo de água por dia: De 4 a 7 ml/100 g.
- Cio pós-parto: Fértil.
- Frequência respiratória: 90 movimentos respiratórios por minuto.
- Consumo de oxigênio por hora: 1,4 ml/g.
- Frequência cardíaca: 360 batimentos por minuto.
- Volume sanguíneo: De 66 a 78 ml/Kg.
- Eritrócitos: De 8 a 9 milhões/mm<sup>3</sup>. De 2 a 16/1000 hemácias de eritrócitos com pontos basofílicos.
- Reticulócitos: De 21 a 54/1000 hemácias.
- Hematócrito: De 43 a 49 %.
- Hemoglobina: De 12,6 a 16,2 g/100 ml.
- Leucócitos: De 7 a 15 mil/mm<sup>3</sup>. De 5 a 34 % de neutrófilos, de 60 a 95 % de linfócitos, de 0 a 4 % de eosinófilos, de 0 a 3 % de monócitos e de 0 a 1 % de basófilos.
- Plaquetas: De 400 a 600 mil/mm<sup>3</sup>.
- Proteína sérica: De 4,3 a 12,5 g/100 ml.
- Albumina: De 1,8 a 5,5 mg/100 ml.
- Globulinas: De 1,2 a 6 mg/100 ml.
- Glicose sérica: De 50 a 135 mg/100 ml.
- Nitrogênio sanguíneo: De 17 a 27 mg/100 ml.
- Creatinina: De 0,6 a 1,4 mg/100 ml.
- Bilirrubina total: De 0,2 a 0,6 mg/100 ml.
- Colesterol: De 90 a 150 mg/100 ml.
- Cálcio sérico: De 3,7 a 6,2 mg/100 ml.
- Fosfato sérico: De 3,7 a 7 mg/100 ml.

## **Anexo 6**

### **Ácido-leucina-arginina glutâmico ou ELR para abreviar**

Os dois resíduos cisteína N-terminais de quimioquinas CXC (ou  $\alpha$ -quimioquinas) são separados por um aminoácido, representado neste nome com um "X". Há 17 quimiocinas diferentes CXC descritas em mamíferos, que são subdivididas em duas categorias, as que têm uma sequência específica de aminoácidos (ou motivo) de ácido-leucina-arginina glutâmico (ou ELR para abreviar) imediatamente antes da primeira cisteína da CXC motivo (ELR-positivo), e aqueles sem um motivo ELR (ELR-negativo). Quimiocinas CXC ELR-positivos induzem especificamente a migração de neutrófilos, e interagem com os receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2. Um exemplo de uma quimioquina CXC ELR-positivo é interleucina-8 (IL-8), o que induz neutrófilos a saírem da corrente sanguínea e entrarem no tecido circundante.