

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

Influência da obesidade sobre a infecção experimental de Gerbils (*Meriones unguiculatus*)  
com *Giardia lamblia*

Luciana Laranjo Amorim Ventura

Belo Horizonte – MG

2016

Luciana Laranjo Amorim Ventura

Influência da obesidade sobre a infecção experimental de Gerbils (*Meriones unguiculatus*)  
com *Giardia lamblia*

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

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Maria Aparecida Gomes

Coorientação: Marcelo Vidigal Caliari

Belo Horizonte – MG

2016

“Porque Deus amou ao mundo de tal maneira que deu seu Filho unigênito, para que todo aquele que Nele crê, não pereça, mas tenha vida eterna”.

*João 3:16*

## **A Deus**

Que indubitavelmente foi quem me permitiu chegar até onde cheguei, me dando forças para permanecer até o fim, quando estas já estavam escassas, me proporcionando sabedoria para enfrentar os mais diversos obstáculos no caminho, e por ter colocado pessoas na minha vida, que foram indispensáveis para me reerguer e me conduzir até o fim...

“Àquele que está sentado no trono, e ao Cordeiro, seja o louvor, e a honra, e a glória, e o domínio pelos séculos dos séculos. Amém!” Apocalipse 5:13

## 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.

*Agradecer*, no dicionário significa demonstrar ou expressar gratidão; dar uma compensação de mesmo valor ou importância; retribuir. Não sei se eu seria capaz de retribuir no mesmo valor o que fizeram por mim, por isso, me resta apenas demonstrar a minha gratidão a vocês...

Sobretudo a *Deus*, por Seu amor Sua bondade e misericórdia para comigo!

Aos meus orientadores *Cidinha e Marcelo*, pela confiança depositada em mim e os ensinamentos que me foram passados ao longo desta caminhada, que certamente permanecerão por toda vida!

À *Dirce*, que foi muito mais do que uma colaboradora desde o início da minha jornada aqui!

Aos estimados *Joãozinho, Edna e Jamil* da bioquímica, pelos ensinamentos passados que nunca seriam adquiridos em sala de aula, à *Rosa* da toxo, que foi um anjo de Deus em momentos essenciais, à *Sibele* e à *Sumara* pela prestatividade!

Aos colegas do *LAPIN*, pelos anos de convivência que agregaram muito mais do que experiência profissional à minha vida e à *Thaísa*, amizade que eu levo daqui pra vida!

Aos *colaboradores* dos inúmeros laboratórios que eu frequentei, mas especialmente ao *Hellton* e à *Camila* pela dedicação em ajudar e pelo tanto que aprendi!

À minha eterna “*Turma do Pepino*”, pelos momentos inesquecíveis que levarei por toda vida, tornando esta caminhada muito mais agradável, mesmo nos momentos tristes!

Aos demais *professores do Departamento de Parasitologia*, pelo ensino, especialmente ao professor *Alan*, que me ensinou que "Mestre não é quem sempre ensina, mas quem, de repente, aprende"!

Especialmente:

*Aos meus amigos, casais e irmãos "de primeira"*, pelo amor demonstrado na torcida sincera, no incentivo inesgotável, no empréstimo dos ombros e ouvidos, nos conselhos dados e acima de tudo, pelas orações, que tanto me fortaleceram!

*A minha família...* à minha *mãe* pela fonte infinita de amor, fazendo tudo que estivesse ao seu alcance para me ajudar, sempre! Ao meu *pai* que nunca duvidou da minha capacidade de chegar aqui! E ao meu *irmão e aos diversos familiares* que sempre torceram por mim...

Ao *Fernando*, a quem me faltam palavras no dicionário para descrever a minha gratidão e o meu amor, e quem conquistou junto comigo essa vitória, me amando, amparando e auxiliando. Com certeza sem você eu não teria chegado até aqui!

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma representativo do delineamento experimental utilizado neste trabalho ..... 46
- Figura 2.** (A) Peso inicial, (B) Peso na 10ª semana, (C) Peso Final, (D) Peso relativo do tecido adiposo e (E) Peso relativo do fígado dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no decorrer do período experimental. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7 ..... 55
- Figura 3.** (A) Consumo médio semanal dos grupos Padrão e Controle durante as primeiras 10 semanas de experimento. (B) Consumo médio dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), após 1 semana do inóculo de *Giardia lamblia*. (C) Consumo médio dos gerbils dos grupos Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), após 1 e 2 semanas do inóculo de *Giardia lamblia*. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7 ..... 56
- Figura 4.** Consumo médio de ácidos graxos dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), durante o experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7. SFA = ácido graxo saturado, MUFA = ácido graxo monoinsaturado, PUFA = ácido graxo poliinsaturado. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7 ..... 57
- Figura 5.** Resultados das dosagens de (A) Colesterol Total, (B) Triglicérides, (C) Proteínas totais, (D) Albumina e (E) Glicose nos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7 ..... 58
- Figura 6.** Resultados das dosagens de (A) Superóxido dismutase (C) Catalase e (E) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e (B) Superóxido dismutase (D) Catalase e (F) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN),

Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 6-7 .....	60
<b>Figura 7.</b> (A) Resultado da dosagem da citocina IL-2, (B) IL-4, (C) IL-5, (D) IL-6, (E) IL-13 e (F) IFN- $\gamma$ no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 5-7 .....	63
<b>Figura 8.</b> Resultados das dosagens de (A) Adiponectina, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-10, (D) IL-6 e (E) Leptina no tecido adiposo epididimal dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 5-7 .....	64
<b>Figura 9.</b> Duodeno de gerbils dos grupos controle sem infecção (CT), controle infectado por 1 semana (CTIN) e controle infectado por 2 semanas (CTIN) .....	69
<b>Figura 10.</b> Duodeno de gerbils dos grupos obeso sem infecção (OB), obeso infectado por 1 semana (OBIN) e obeso infectado por 2 semanas (XOBIN) .....	70
<b>Figura 11.</b> Estruturas em forma de coroa no tecido adiposo dos gerbils dos grupo Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 5-6 .....	71
<b>Figura 12.</b> Fígado de gerbils dos grupos controle sem infecção (CT), controle infectado por 1 semana (CTIN), controle infectado por 2 semanas (CTIN) e obeso sem infecção (OB), obeso infectado por 1 semana (OBIN) e obeso infectado por 2 semanas (XOBIN) .....	73



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição em nutrientes das dietas experimentais .....	44
<b>Tabela 2.</b> Resultados da extração e quantificação de lipídeos no fígado e no conteúdo fecal dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 6-7.....	61
<b>Tabela 3.</b> Resultados das dosagens das citocinas IL-1, IL-10, IL-17 e TNF- $\alpha$ no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 6-7. ....	62
<b>Tabela 4.</b> Resultados das dosagens das citocinas IL-1, IL-4, IL-13, IL-17 e IFN- $\gamma$ na cultura de células do baço dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 6-7. ....	62
<b>Tabela 5.</b> Intensidade de parasitismo no duodeno e Infiltrado inflamatório na lâmina própria dos grupos Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento .....	67
<b>Tabela 6.</b> Análise morfométrica das vilosidades e criptas duodenais de gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n= 7.....	68
<b>Tabela 7.</b> Avaliação da deposição de gordura no tecido hepático dos gerbils dos grupos dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão. n=7. ....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AGLs** – Ácidos Graxos Livres

**AMPK** – Adenosina Mono Fosfato quinase

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CDC** – Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

**CLS** – Estruturas semelhantes a coroas (do inglês *Crown-Like Structures*)

**CT** – Controle

**CTIN** – Controle Infectado por uma semana

**DC** – Células Dendríticas (do inglês *Dendritic cells*)

**EHNA** - Esteatose Hepática Não-Alcoólica

**ELISA** – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

**eNOS** – Oxido Nítrico Sintase endotelial

**H&E** - Hematoxilina e Eosina

**HP** – Hiper

**IBD** – Doença inflamatória intestinal (do inglês *Inflammatory Bowel Disease*)

**Ig** – Imunoglobulina

**IFN- $\gamma$**  – Interferon  $\gamma$

**IL** – Interleucina

**IMC** – Índice de Massa Corporal

**iNOS** – Oxido Nítrico Sintase indutível

**LAPI** – Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais

**MDA** – Malonaldeído

**MUFA** – Ácidos graxos monoinsaturados (do inglês, *Monounsaturated Fatty Acid*)

**NASH** – Esteatohepatite não-alcoólica (do inglês *nonalcoholic steatohepatitis*)

**nNOS** – Oxido Nítrico Sintase neuronal

**NO** – Oxido Nítrico

**NK** – Células Natural Killer

**OB** – Obeso

**OBIN** – Obeso Infectado por uma semana

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAM** – Peptídeos antimicrobianos

**PAS** - Ácido Periódico de Schiff

**PBS** – Solução Salina Tamponada

**PUFA** – Ácidos graxos poliinsaturados (do inglês, *Poliunsaturated Fatty Acid*)

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

**RPM** – Rotações por Minuto

**SFA** – Ácidos graxos saturados (do inglês, *Saturated Fatty Acid*)

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SOD** – Superóxido Dismutase

**TBARs** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

**TGL** – Triglicérides

**Th** – Células T *helper*

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*)

**UFA** – Ácidos graxos insaturados (do inglês, *Unsaturated Fatty Acid*)

**UFA/SFA** – Razão Ácidos graxos saturados/Ácidos graxos insaturados

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**VLDL** - Lipoproteínas de muito baixa densidade (do inglês *Very Low Density Lipoprotein*)

**WHO** – *World Health Organization*

**XCTIN** – Controle infectado por duas semanas

**XOBIN** – Obeso infectado por duas semanas

**ZO** – Zona Ocludente

**ZO 1**– Proteína da zona ocludente

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	i
<b>Lista de Tabelas</b> .....	iii
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	<b>15</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1. Objetivo Geral .....	42
3.2. Objetivos Específicos .....	42
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1. Animais .....	43
4.2. Delineamento experimental e coleta de tecidos .....	43
4.3. Avaliação do peso corporal, adiposidade e consumo alimentar .....	47
4.4. Dosagens plasmáticas .....	47
4.5. Avaliações realizadas no intestino delgado .....	47
4.5.1. Contagem de trofozoítos desprendidos do epitélio intestinal .....	47
4.5.2. Histopatologia e morfometria do duodeno .....	47
4.5.3. Extração e determinação de citocinas .....	48
4.5.4. Dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS .....	49
4.5.5. Dosagem da atividade da enzima antioxidante catalase .....	49
4.5.6. Dosagem da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase .....	49
4.6. Avaliações realizadas no tecido adiposo .....	50
4.6.1. Quantificação das estruturas semelhantes a coroas (Crown-Like Structures – CLS) .....	50
4.6.2. Extração e determinação de citocinas .....	50
4.7. Avaliações realizadas no fígado .....	50
4.7.1. Histopatologia e morfometria da esteatose hepática .....	50
4.7.2. Extração e quantificação de lipídeos .....	51
4.7.3. Avaliação do estresse oxidativo .....	51
4.8. Avaliação realizada no conteúdo fecal .....	51

4.8.1.	Extração e quantificação de lipídeos	51
4.9.	Avaliações realizadas no baço	52
4.9.1.	Cultura de células	52
4.9.2.	Determinação de citocinas	52
4.10.	Análise estatística	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
	REFERÊNCIAS	<b>88</b>
	ANEXOS	<b>121</b>

## RESUMO

Atualmente, o número de indivíduos obesos no mundo tem atingido proporções alarmantes, o que tem chamado muita atenção devido às alterações metabólicas, imunológicas e ainda, à maior susceptibilidade a doenças infecciosas que a obesidade pode desencadear. Nos últimos anos tem surgido estudos que buscam esclarecer qual o impacto da adiposidade também nas infecções parasitárias. Entretanto, ainda não existem estudos sobre a associação entre obesidade e giardíase, a parasitose mais frequente em países desenvolvidos e com elevada prevalência em países em desenvolvimento. Como a prevalência de ambas as doenças se sobrepõe em diversas áreas, é importante avaliar se esta parasitose seria influenciada pelas debilidades na resposta imunológica de hospedeiros obesos. Foram utilizados 42 gerbils, machos, com idade média de 25 semanas, distribuídos em 6 grupos, com 7 animais cada: Controle (CT), Controle Infectado por 1 semana (CTIN) e Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), recebendo dieta com 68%, 7% e 20% de calorias provenientes de carboidratos, lipídeos e proteínas, respectivamente; Obeso (OB), Obeso Infectado por 1 semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), com dieta contendo 42%, 37,5% e 20% de calorias provenientes de carboidratos, lipídeos e proteínas, respectivamente. Na 10ª semana de experimento, os animais dos grupos CTIN, XCTIN, OBIN e XOBIN foram infectados com *Giardia lamblia*, oralmente, permanecendo infectados por 7 ou 14 dias, conforme o grupo, quando todos animais foram eutanasiados e coletados sangue, intestino delgado, tecido adiposo, fígado, baço e conteúdo fecal. Os animais foram pesados semanalmente utilizando-se balança com escala. A avaliação bioquímica, as dosagens séricas de glicemia, proteínas totais, albumina, colesterol e triglicerídeos foram determinadas por ensaio enzimático. As dosagens de citocinas foram feitas por ELISA. A determinação dos lípides hepáticos e fecais foi realizada conforme descrito por Folch e colaboradores. A avaliação do estresse oxidativo baseou-se na dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, na dosagem de catalase e de superóxido dismutase. Para análise histológica, a porção proximal do intestino delgado, uma fração do fígado e do tecido adiposo epididimal foram coletadas, fixadas e destinadas à obtenção de cortes e coloração com Hematoxilina & Eosina. A altura das vilosidades, profundidade de criptas e área total ocupada por gordura foram calculadas através do software KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. Os resultados foram expressos em média±erro padrão, utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra e a Análise de Variância, seguida do teste de Newman-Keuls ou de Dunn para comparação entre os grupos experimentais. Utilizou-se o programa Prisma versão 6.0, considerando-se um nível de significância de 5%. Observou-se que os gerbils obesos apresentaram maior peso corporal, dos pesos relativos do tecido adiposo e do fígado, dislipidemia, maior deposição hepática de gordura total, colesterol e triglicerídeos, além da alteração da produção de adipocinas, tornando-o bom modelo para o estudo desta patologia associada ou não à infecção parasitária. A infecção por *G.lambli*a nos animais controle acarretou em lesão nas vilosidades e criptas intestinais, aumento de inflamação na submucosa e maior expressão de citocinas no intestino, principalmente na primeira semana de infecção. Além disso, provocou maior inflamação no tecido adiposo e deposição de lípides no fígado que se reestabeleceram na semana seguinte. Em obesos, não houve aumento de IL-2, 5 e 6 suficientemente permanente para conter a infecção, causando maior lesão no intestino e mais estresse oxidativo no fígado. Os grupos OBIN e XOBIN apresentaram ainda maior excreção de lípides nas fezes e XOBIN menor peso e adiposidade. Gerbils são modelos efetivos para estudo da obesidade induzida pela dieta. Além disso, a obesidade induzida pela dieta ocasionou alterações imunológicas e morfométricas em vários tecidos dos gerbils que prejudicaram a contenção do processo infeccioso por *G. lamblia*.

## ABSTRACT

Nowadays, the number of obese people in the world has reached alarming proportions, which has brought so much attention because of the metabolic, immunological and the increased susceptibility to infectious diseases that obesity can trigger. In recent years, the number of studies that seek to clarify the impact of adiposity also in parasitic infections have been increasing. However, there are no studies on the association between obesity and giardiasis, the most frequent parasitic disease in developed countries with a high prevalence in developing countries. As the prevalence of both diseases overlap in many areas, it is important to evaluate if this parasitosis would be influenced by the weaknesses in the immune response of obese hosts. 42 gerbils, males with a mean age of 25 weeks were used, divided into 6 groups with 7 animals each: control (CT), Infected Control for 1 week (CTIN) and Infected Control for 2 weeks (XCTIN), receiving diet with 68%, 7% and 20% of calories from carbohydrates, lipids and proteins, respectively; Obese (OB), Obese Infected for 1 week (OBIN) and obese Infected for 2 weeks (XOBIN) with diet containing 42%, 37.5% and 20% of calories from carbohydrates, lipids and proteins, respectively. In the 10th week of the experiment, the animals of the groups CTIN, XCTIN, OBIN and XOBIN were orally infected with *Giardia lamblia*, and remain infected for 7 or 14 days, according to the group, when all animals were euthanized and collected blood, small intestine, adipose tissue, liver, spleen and fecal contents. The animals were weighed weekly using scale. For biochemical evaluation, serum glucose, total protein, albumin, cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic assay. Cytokines dosages were performed by ELISA. The determination of liver and fecal lipids was performed as described by Folch et al. The evaluation of oxidative stress was based on the determination of the concentration of thiobarbituric acid reactive substances and the dosage of catalase and superoxide dismutase. For histological analysis, the proximal portion of the small intestine, a fraction of liver and epididymal adipose tissue were collected, fixed and intended for obtaining sections and staining with Hematoxylin & Eosin. The villus height, crypt depth and the total area occupied by fatty liver were calculated using the KS300 software from the Carl Zeiss image analyzer. The results were expressed in mean  $\pm$  standard error, using the Shapiro-Wilk test to verify the normality of the sample, and analysis of variance, followed by Newman-Keuls or a Dunn's test for comparisons between experimental groups. We used the Prism version 6.0, considering a 5% significance level. It was observed that obese gerbils showed higher body weight, relative weight of adipose tissue and liver, dyslipidemia, increased hepatic deposition of total fat, cholesterol and triglycerides in addition to changed adipokines production, making it a good experimental model for this disease with or without parasitic infection. *G. lamblia* infection in control animals resulted in intestinal villi and crypts injury, increase submucosal inflammation and increased expression of cytokines in the intestine, especially in the first week of infection. Furthermore, it caused increased inflammation in adipose tissue and lipid deposition in the liver that reestablished the following week. In obese, there was no permanent increase in IL-2, 5 and 6 sufficiently to contain the infection, causing greater damage in the intestine and more oxidative stress in the liver. The OBIN and XOBIN groups still showed a higher excretion of lipids in feces and XOBIN lower weight and adiposity. Gerbils are effective models for the study of obesity induced by diet. In addition, the diet-induced obesity caused immunological and histological changes in various tissues of gerbils that impaired the containment of the *G. lamblia* infection.



## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas quatro décadas, um mundo onde a prevalência de desnutrição era mais que o dobro de obesidade, tornou-se um mundo no qual o número de indivíduos obesos tem atingido proporções alarmantes, superando o número de pessoas abaixo do peso a nível global, exceto em partes da África subsaariana e da Ásia (NCD-RisC, 2016). Mudanças nos padrões sociais, comportamentais e econômicos ocorridos desde a década de 70, foram responsáveis por modificações nos costumes da população em todo o mundo, levando ao aumento indiscriminado da ingestão de alimentos altamente energéticos, ricos em gordura e açúcares e ao aumento de inatividade física, devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, das mudanças nos modos de transporte e da crescente urbanização (Popkin et al, 2012).

### 1.1. *Obesidade: definição e epidemiologia*

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define sobrepeso e obesidade como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo que podem prejudicar a saúde, causado essencialmente por um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas (WHO, 2016). Anteriormente, a obesidade era considerada um problema de saúde de países com rendimento elevado, entretanto, o excesso de peso está agora em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em ambientes urbanos. Nos países em desenvolvimento, com economias emergentes (classificados pelo Banco Mundial como países de renda média e baixa), a taxa de aumento de sobrepeso e obesidade na infância tem sido superior a 30% em comparação com países desenvolvidos (Popkin et al, 2012).

Segundo dados mais atuais da OMS, a obesidade mais do que duplicou desde 1980 em todo o mundo. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos, com 18 anos ou mais, estava acima do peso, o que representa 39% dos adultos, ou seja, mais de 1/3 da população mundial. Destes, mais de 600 milhões, ou 13%, eram obesos (WHO, 2016). De semelhante modo, em 2014, 41 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade estavam acima do peso ou obesas, o que merece grande atenção, uma vez que cerca de 55% das crianças obesas permanecem obesas na adolescência, cerca de 80% dos adolescentes obesos ainda serão obesos na idade adulta e cerca de 70% serão obesos com mais de 30 anos (WHO, 2016; Simmonds et al, 2016). Por estes motivos, a obesidade já é considerada uma pandemia pela OMS, sendo que a

maior parte da população mundial vive em países onde o excesso de peso e a obesidade matam mais pessoas do que o baixo peso (WHO, 2016).

Dentre todos os obesos do mundo, mais de 50% estão concentrados em apenas dez países, sendo o Brasil um deles (Marie et al, 2014). Pesquisas nacionais recentes, demonstram que esta elevada prevalência de obesos no país, é reflexo de hábitos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, demonstrado pela pouca prática de atividade física, além de consumo abusivo de álcool e maus hábitos alimentares (IBGE, 2014). Dentre as crianças com menos de dois anos de idade, 60,8% consomem doces, como bolo e biscoitos e 32,3% consomem refrigerantes e sucos artificiais. Já entre os adultos, o consumo de alimentos naturais e saudáveis nas quantidades ideais ainda está muito aquém do recomendado, enquanto a ingestão abusiva (mais de cinco vezes por semana) de gorduras, doces e alimentos industrializados, está além do ideal (BRASIL, 2015).

O aumento mundial de indivíduos obesos vem instigando muita atenção, uma vez que a obesidade está altamente associada ao maior risco de desenvolvimento da síndrome metabólica, que é caracterizada por obesidade central, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e esteatose hepática não-alcoólica (EHNA) (Lumeng & Saltiel, 2011). A obesidade e as doenças metabólicas associadas, estão entre as mais comuns e deletérias doenças que afetam mais de 50% da população adulta (Wellen & Hotamisligil, 2005). Acredita-se que é a inflamação induzida pela obesidade que contribui para o desenvolvimento de muitas destas doenças crônicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose, doenças hepáticas e algumas formas de câncer (Lumeng & Saltiel, 2011; Gregor & Hotamisligil, 2011). Por essas razões, este aumento desenfreado nos números mundiais de indivíduos obesos tem sido tão preocupante.

## ***1.2. O tecido adiposo e o sistema imunológico***

O tecido adiposo humano é dividido em tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco. O primeiro é um tecido regulamentar importante, presente em abundância nos primeiros anos de vida e responsável pela manutenção da temperatura corporal e do gasto de energia em todo o corpo (Hibi et al, 2016). Ultimamente, tem sido revelado que humanos adultos também tem tecido adiposo marrom ativo que apresenta papel protetor contra a obesidade e diabetes através da regulação da termogênese induzida pelo frio (Matsushita et al, 2014). Assim como o tecido adiposo marrom, o tecido adiposo branco foi, por muitos anos, considerado exclusivamente um tecido de armazenamento de energia. No entanto, em décadas

passadas, seu papel como órgão multifuncional atuando não apenas como relevante depósito de energia, mas também com importantes funções endócrinas e imunológicas, foi amplamente demonstrado (Fruhbeck et al, 2001, Tilg & Moschen 2006). Além de adipócitos, que são o tipo de célula mais abundante no tecido adiposo branco, este tecido contém também pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, leucócitos e macrófagos (Sánchez et al, 2005, Kanneganti & Dixit 2012).

Em mamíferos obesos, o aumento dos depósitos de gordura branca é devido à hiperplasia e hipertrofia de seus adipócitos (Dulloo et al, 2010). Estas células, são as principais do tecido adiposo responsáveis pela ativação e liberação de adipocinas como a IL-6, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a leptina, a adiponectina e quimiocinas como a CCL2, também conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1 (ou MCP-1, do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein 1*) (Fantuzi 2005). Nas fases iniciais da expansão do tecido adiposo, estas funções podem ser afetadas por uma série de fenômenos como o estresse oxidativo, hipóxia e a sub-regulação de algumas quimiocinas, levando o organismo a assumir um padrão pró-inflamatório que poderá afetar o funcionamento adequado de diversos tecidos (Wellen & Hotamisligil, 2005). Assim, com a progressão da obesidade, há ainda o recrutamento e ativação de outras células do sistema imunológico como os macrófagos que, por sua vez, sofrem polarização de fenótipo modificando seu perfil anti-inflamatório, composto por macrófagos M2 ou "classicamente ativados" para o perfil pró-inflamatório, de macrófagos M1 ou "alternativamente ativados", aumentando a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias mas, principalmente, TNF- $\alpha$  (Lumeng 2007; Gregor 2011). Outras fontes desta importante citocina além dos macrófagos recrutados, são os macrófagos do próprio tecido adiposo dos indivíduos obesos que, depois de ativados, são fonte adicional desta citocina e de outros mediadores solúveis (Xu et al, 2003; Fantuzzi 2005). Uma vez que os macrófagos estão presentes e ativos no tecido adiposo, em conjunto com os adipócitos e outros tipos de células locais, pode-se perpetuar um ciclo vicioso de recrutamento de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias (Fantuzzi 2005).

O TNF- $\alpha$  induz a liberação de ácidos graxos livres (AGLs) dos adipócitos via lipólise (Cawthorn & Sethi, 2008) que, por sua vez, estimulam fortemente a produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos (Klop, Elte & Cabezas, 2013). Esta interação parácrina entre adipócitos e macrófagos constitui um "ciclo vicioso" acelerando ainda mais a inflamação do tecido adiposo, promovendo ainda, seus efeitos inibitórios sobre a sinalização de insulina e o metabolismo de energia (Clemente-Postigo et al, 2011). A grande maioria (> 90%) dos macrófagos presentes, encontra-se em torno de adipócitos mortos, onde parecem estar reabsorvendo os restos de lipídeos destas células, formando as denominadas estruturas

semelhantes a coroas (do inglês, *Crown-Like Structures – CLS*), que são uma medida direta da infiltração dessas células no tecido adiposo e, conseqüentemente, da inflamação do mesmo (Cinti et al, 2005).

Além do reconhecido aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de indivíduos obesos, há ainda aumento na concentração de outras adipocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas 6 (IL-6) e IL-1 $\beta$ , dentre outras (Jung & Choi, 2014). A IL-6, parece inibir a sinalização da insulina sistemicamente, desempenhando também, um papel importante no desenvolvimento de resistência à insulina na obesidade, tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro* (Bastard et al, 2002). Já a citocina IL-1 $\beta$ , juntamente com TNF- $\alpha$ , pode induzir o aumento da síntese e da liberação de leptina (Paz-Filho et al, 2012), adipocina envolvida na regulação da homeostase da energia, inibindo o apetite e estimulando o gasto energético (St-Pierre & Tremblay, 2012). No entanto, os níveis circulantes de leptina e sua expressão no tecido adiposo são aumentados em indivíduos obesos, provavelmente devido à existência de resistência à leptina (Myers et al, 2010).

Em contrapartida, a redução da produção das adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, é também característico da obesidade induzida pela dieta. Em condições normais, esta citocina é amplamente produzida pelo tecido adiposo e atua, principalmente, promovendo a ativação da proteína quinase ativada por Adenosina Mono Fosfato (AMPK), que fosforila enzimas estimuladoras da glicólise, da gliconeogênese e da beta oxidação de lipídeos no fígado e no músculo esquelético, além de induzir a expressão de IL-10, em macrófagos M2 (van Stijn et al, 2015). Além disso, a adiponectina também induz a ativação da lipase lipoprotéica (LPL), aumentando assim a secreção de VLDL pelo fígado e a redução dos níveis de triglicérides no plasma (Yamauchi et al, 2002). A diminuição da adiponectina poderá levar também à menor produção de IL-10 no entanto, seus níveis plasmáticos diminuídos em indivíduos obesos podem ser reestabelecidos com a perda de peso, bem como a sensibilidade à insulina (Golubović et al, 2013).

Assim como a expressão de citocinas, adipocinas e quimiocinas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ou ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) sofre alterações durante a obesidade. O desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade do sistema biológico em prontamente desintoxicar os intermediários reativos ou facilmente reparar o dano resultante dessa produção excessiva, é denominado estresse oxidativo (Winterbourn 2008). A produção de ROS ocorre em condições fisiológicas e em muitas doenças, causando dano direto ou indireto em diferentes órgãos. Tem sido relatado que a obesidade, bem como dietas ricas em gorduras e carboidratos, podem induzir um aumento significativo de estresse

oxidativo sistêmico, o que está associado à produção irregular de adipocinas (Le Lay et al, 2014). Em contraste, marcadores de defesa antioxidantes são reduzidos de acordo com a diminuição da adiposidade corporal e visceral (Chrysohoou et al, 2007, Hartwich et al, 2007). Assim, quando a obesidade persiste durante um longo período de tempo, as fontes de antioxidantes podem estar atenuadas, com baixa atividade de enzimas tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Amirkhizi et al, 2007).

Outra alteração sistêmica relacionada à obesidade é o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (EHNA) (Tarantino et al, 2010). Durante este agravo, os hepatócitos ficam mais suscetíveis às toxinas bacterianas intestinais, à disfunção mitocondrial, à apoptose desregulada, ao estresse oxidativo, à ação de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, à disfunção mitocondrial, à ativação de fatores pró-fibrogênicos e de células estreladas hepáticas, que contribuem para a progressão da doença e o surgimento de cirrose hepática (Tilg & Moschen, 2010; Tarantino et al, 2010; Polyzos et al, 2012). As doenças do fígado gorduroso não alcoólicas, dentre as quais está incluída a esteatose, são importante problema de saúde pública devido à alta prevalência em todo o mundo, variando de 11% a 46% (Angulo 2007, Lazo & Clark 2008, Williams et al, 2011). A prevalência aumenta para 58% em indivíduos com excesso de peso e pode chegar a 98% em indivíduos obesos não-diabéticos (Machado et al, 2006).

O fígado desempenha papéis importantes no metabolismo lipídico, como a captação de AGLs para síntese, armazenamento e secreção de lipídios. Qualquer alteração em um destes processos pode levar ao desenvolvimento de EHNA (Musso et al, 2009). Na obesidade, o aumento da produção de TNF- $\alpha$ , oriundo do tecido adiposo, provoca uma liberação descontrolada de AGLs dos adipócitos via lipólise (Clemente-Postigo et al, 2011) que, além de provocar alterações plasmáticas, contribui fortemente com o acúmulo de lipídeos no fígado (Donnelly et al, 2005), excedendo a capacidade de depuração do tecido, via  $\beta$ - oxidação ou pela liberação de triglicerídeos (Bradbury et al, 2004; Polyzos et al, 2012). Em obesos, a incapacidade da insulina em suprimir a lipólise, como consequência da resistência à insulina, resulta em aumento da lipólise no tecido adiposo, exacerbando a liberação de ácidos graxos livres e o influxo dos mesmos diretamente para o fígado via veia porta (Roden, 2006). Além disso, como já foi dito previamente, há uma menor oxidação destes AGLs no fígado, uma vez que não há ativação suficiente de AMPK, já que os níveis de adiponectina são menores (Yamauchi et al, 2002).

Todas as alterações decorrentes da expansão do tecido adiposo sobre as células do sistema imunológico podem conduzir o organismo a uma inflamação local e sistêmica

(Fhuhbeck et al, 2001, Tilg & Moschen 2006), conduzindo indivíduos obesos à alteração de função do sistema imune, quando comparados com indivíduos de peso adequado, levando-os à maior susceptibilidade à doenças infecciosas (Marti et al. 2001, Smith et al. 2007, Moulin et al. 2009, Karlsson et al. 2010).

### **1.3. Obesidade e Microorganismos**

Os campos de pesquisa investigando a associação entre infecções e patógenos ambientais com a obesidade, tem emergido nos últimos anos, devido à potencial interferência que poderiam ter em indivíduos obesos (Hegde & Dhurandhar, 2013).

O aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) tem sido associado com maior risco para diversas infecções bacterianas e virais como infecções periodontais (Ylöstalo et al, 2008), infecção gástrica por *Helicobacter pylori* (Perdichizzi et al, 1996) e infecção pelo herpes simplex vírus 1 (Karjala et al, 2011) assim como com o aumento da susceptibilidade (Mancuso 2010) e piora de infecções pulmonares por *Klebsiella* (Mancuso 2002) e *Streptococcus pneumoniae* (Hsu et al, 2007). Outros estudos também demonstraram maior carga pulmonar de *Mycobacterium tuberculosis* (Wieland et al, 2005) e eliminação tardia de *Mycobacterium abscessus* em camundongos obesos (Ordway et al, 2008) após desafio com o patógeno.

Pesquisas realizadas com camundongos submetidos à dieta indutora de obesidade, demonstraram que nestes animais há maior morbidade e mortalidade durante a infecção primária ou secundária pelo vírus influenza (Smith et al, 2007, Smith et al, 2009), reduzida atividade de células natural killer (NK) e de células dendríticas e prejuízo na função de células T CD8+ (Smith et al, 2007, Smith et al, 2009, Karlsson et al, 2010), quando comparados ao grupo de animais saudáveis. Em humanos, tem sido demonstrado que a obesidade está associada a maior morbidade e mortalidade após a infecção com a cepa pandêmica do vírus H1N1 (Jain & Chaves, 2011), resultando em maior número de hospitalizações (Kwong et al, 2011) e maiores complicações respiratórias em crianças (Akiyama et al, 2011). Além disso, vários estudos relataram a obesidade como fator de risco independente para infecções pós-operatórias (Potapov et al, 2003, Davenport et al, 2009).

#### 1.4. *Obesidade e Parasitoses*

Da mesma maneira que o estudo da relação entre obesidade e microrganismos, como vírus e bactérias, tem ampliado na última década, a associação entre o excesso de peso e parasitoses também tem ganhado espaço. Duas vertentes são consideradas: o agravamento da infecção decorrente das alterações advindas do tecido adiposo e a possível modulação da adiposidade pelos parasitos, atenuando suas consequências.

Robert et al. (2008), trabalhando com camundongos C57BL/6, machos, silenciados para o gene de expressão da leptina (ob/ob) e infectados com *Plamodium bergei* cepa ANKA, demonstraram que estes animais não desenvolveram malária cerebral, apresentando aumento progressivo da parasitemia e anemia grave com morte após 18-25 dias, enquanto os animais do grupo controle infectados desenvolveram síndromes neurológicas rápidas e morte em 6 dias. Estes autores sugeriram que tal efeito “protetor” da obesidade poderia ter sido causado pela ausência de leptina que os animais “ob/ob” apresentam, uma vez que este hormônio é um mediador da resposta inflamatória exacerbada. Em contraste com estes resultados, pesquisadores utilizando camundongos obesos induzidos por glutamato monossódico, infectados com *Plamodium bergei* cepa ANKA, mostraram que os animais obesos morreram antes dos controles. Estes autores associaram este fato à elevada produção de citocinas pró-inflamatórias que, mesmo levando à eliminação do parasito, estaria acelerando o dano cerebral e assim, causando a morte dos animais (de Carvalho et al, 2015).

Semelhantemente, estudo associando obesidade induzida por dieta e camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*, mostrou que este parasito é um potente fator de risco para a progressão de desordens imunometabólicas associadas à obesidade, como diabetes e aterosclerose (Cabalen et al, 2016).

Na mesma linha, a infecção por *Leishmania infantum chagasi* ocasionou nos camundongos obesos maior carga parasitária no fígado e no baço, aumento de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de citocinas anti-inflamatórias no tecido adiposo, baço e fígado, sugerindo que a obesidade possa interferir nas respostas imunológicas oriundas de agentes patogênicos, prejudicando a imunidade protetora anti-*Leishmania* (Sarnáglia et al, 2016).

Em seres humanos, um estudo feito com crianças, demonstrou que aquelas que tinham infecção moderada a grave por *Entamoeba coli* apresentaram maior circunferência de cintura, maior relação cintura-altura, e maior adiposidade corporal e abdominal que as crianças não infectadas ou com pouco grau de infecção (Zavala et al., 2015).

Outro trabalho realizado em Munique, Alemanha, com 999 adultos de ambos os sexos, entre 18-80 anos, encontrou títulos de Imunoglobulina G (IgG) anti *Toxoplasma gondii* significativamente mais elevados em indivíduos obesos, em comparação com indivíduos não-obesos (Reeves, 2013).

Em contrapartida, estudo realizado com camundongos infectados por *Nippostrongylus brasiliensis*, demonstrou que os animais alimentados com dieta rica em gordura e infectados com o parasito, tiveram redução no peso corporal e na adiposidade, melhora no metabolismo de glicose, regressão da esteatose hepática, além de mudança do fenótipo dos macrófagos do tecido adiposo, caracterizado por maior expressão de marcadores de macrófagos tipo M2 (Yang et al., 2013).

Por fim, dados recentes associando dietas hiperlipídicas e infecção por *Schistosoma mansoni* em roedores, demonstram que a infecção crônica reduziu o ganho de peso corporal, o ganho de tecido adiposo, e o tamanho dos adipócitos. Reduziu também a resistência à ação da insulina e modificou o fenótipo de macrófagos para o tipo M2 no tecido adiposo. Acredita-se que os helmintos possam apresentar efeitos metabólicos positivos em obesos, pela indução da resposta imunológica do tipo Th2, reduzindo a inflamação crônica de baixo grau, característica da obesidade (Hussaarts et al, 2015).

Mesmo com os inúmeros estudos associando parasitoses e obesidade que vêm surgindo nos últimos cinco anos, até o presente momento, não há nenhuma pesquisa relacionando giardíase à obesidade. Apesar do impacto clínico da giardíase ser bem conhecido em crianças (Newman et al, 2001, Demirci et al, 2003, Carvalho-Costa et al, 2007, Matos et al, 2008, Al-Mekhlafi et al, 2010, Nkrumah & Nguah, 2011, Júlio et al, 2012) e em indivíduos imunossuprimidos (Feitosa et al, 2001, Bachur et al, 2008, Gonçalves et al, 2009, Cardoso et al, 2011), seu impacto em indivíduos obesos ou com sobrepeso é desconhecido, não havendo evidências que estabeleçam a obesidade como fator agravante ou protetor da doença.

### **1.5. Giardíase: definição e epidemiologia**

Dos microorganismos eucariotos pertencentes ao reino Protista, os protozoários do gênero *Giardia* merecem considerável atenção devido à sua patogenicidade, especialmente em crianças e animais jovens (Thompson 2000, Koot et al, 2009). A giardíase, infecção intestinal causada pela *Giardia lamblia*, é uma das parasitoses mais comuns em todo o mundo, presente tanto em países desenvolvidos (CDC 2010) como naqueles em



desenvolvimento (Dib et al, 2008). Estima-se que, ocorram cerca de 280 milhões de casos sintomáticos por ano (Lane & Lloyd 2002, Alia & Hilla, 2003) que, quando decorrentes em crianças, podem acarretar perdas nutricionais intensas, levando a déficits cognitivos e de crescimento graves (Niehaus et al, 2002, Berkman et al, 2003). Devido à sua alta prevalência e sintomatologia, a doença foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde em 2004 (OMS) (Savioli et al, 2006).

A giardíase é uma doença disseminada em todo o mundo. A resistência do cisto, mantendo-o por períodos prolongados no meio ambiente, aliada à sua capacidade de propagação em reservatórios antroponóticos (Thompson & Monis 2012) e zoonóticos (Feng & Xiao 2011), e à baixa dose infecciosa (Araújo et al, 2008), possibilitam que a infecção ocorra até mesmo em regiões repletas de recursos. Em grande parte dos países ricos, a *G. lamblia* é um dos parasitos intestinais mais comumente identificados, alcançando taxas de prevalência entre 2-5% (Hörman et al, 2004, CDC 2010), sendo a causa mais frequente de surtos epidêmicos de diarreia, relatados nos Estados Unidos (Baldursson & Karansis, 2011). Na Ásia, África e América Latina, onde aproximadamente 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, pois contribui de forma substancial para a geração de adultos com déficit no desenvolvimento físico e cognitivo (Bussatti et al, 2009), bem como com outras sequelas a longo prazo (Halliez & Buret, 2013; Hanevik et al, 2014).

No Brasil, a prevalência da doença varia conforme a localidade, as populações estudadas e a metodologia empregada no estudo, sendo a faixa etária mais atingida a de lactentes e pré-escolares, constituindo-se, nessa população, um sério problema de saúde pública. Estudos avaliando a ocorrência de giardíase em crianças de várias regiões brasileiras mostraram que embora a prevalência desta parasitose tenha diminuído na última década, ainda permanece elevada variando de 4,7% a 27,5% (Carvalho-costa et al, 2007a, Pereira et al, 2007, Basso et al, 2008, Machado et al, 2008, Menezes et al, 2008, Korkes et al, 2009, Tashima et al, 2009, Moreno et al, 2010, Santos et al, 2012). Análises mais recentes, utilizando métodos de diagnósticos moleculares (Boadi et al, 2014), não só reiteraram a ampla gama de variabilidade nos resultados de infecções por *Giardia* em pacientes pediátricos (Muhsen & Levine, 2012), como também revelaram que a exposição ao parasito pode ser muito maior do que as estimativas baseadas em técnicas microscópicas (Liu et al, 2014). Sendo assim, é possível que apesar das estimativas existentes, possivelmente a prevalência da infecção em todo o mundo seja ainda muito subestimada.

## 1.6. Taxonomia e Nomenclatura

Os parasitos deste gênero pertencem ao filo Sarcomastigophora, à classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida, família Hexamitidae. Foram primeiramente observados por Antoine van Leeuwenhoek em 1681, ao examinar as próprias fezes ao microscópio (Dobell 1920) entretanto, foi apenas em 1859 que Lambl descreveu detalhadamente o protozoário que pensava pertencer ao gênero *Cercomonas*, dando-lhe o nome de *Cercomonas intestinalis* (Lambl 1859). Em 1882, Kunstler utilizou pela primeira vez o nome *Giardia* para o gênero, ao descrever um microorganismo de girinos. Em 1888, Blanchard sugeriu o nome *Lambliia intestinalis*, que Stiles, em 1902, mudou para *Giardia duodenalis*. Posteriormente, Kofoid e Christiansen propuseram os nomes *G. lamblia* no ano de 1915 e *G. enterica* em 1920, permanecendo-se por alguns anos as controvérsias a respeito do real número de espécies existentes no gênero. Com base em critérios morfológicos, Simon, em 1922, distinguiu as espécies *G. lamblia* e *G. muris*, aceitando o nome *G. lamblia* para a forma de ocorrência em humanos, nomenclatura que se tornou amplamente aceita até a década de 1970. Desde os anos 1980, alguns pesquisadores tem incentivado o uso do nome *G. duodenalis*, e na década de 1990, o nome *G. intestinalis* tem sido incitado por outros investigadores (Kulda & Nohynkova, 1996). No entanto, ainda não parece haver razão suficiente para abandonar o termo *G. lamblia*, amplamente aceito na literatura médica e científica.

A partir da segunda metade do século XX, diversas espécies do gênero *Giardia* foram descritas, baseados na especificidade de hospedeiro, e não em critérios morfológicos, conforme proposto por Filice (1952). Sendo assim, com base na morfologia dos parasitos, atualmente são reconhecidas apenas as espécies *Giardia muris* e *Giardia microti* parasitando roedores, *Giardia agilis* que infecta anfíbios, *Giardia psittaci*, parasito de periquitos, *Giardia ardea*, que infecta garças azuis e *Giardia lamblia* que infecta aves, a maioria dos mamíferos e é a responsável pela doença em humanos (Thompson et al, 2000).

Todos os isolados pertencentes à espécie *G. lamblia* são parasitos de mamíferos e apresentam pouca variação na sua morfologia, no entanto, demonstram alterações genéticas que podem conferir variação antigênica e a alta especificidade de hospedeiro, encontradas em cada uma delas, sendo inicialmente distribuídos em oito genótipos diferentes (A-H) (Adam et al, 2013). As linhagens A e B são as responsáveis pela infecção humana, mas também são encontradas em uma ampla variedade de mamíferos. Sugere-se que a linhagem B possa causar sintomatologia mais grave que a A, porém, tais dados ainda são controversos, uma vez que

não apenas os fatores relacionados ao parasito, mas também características relacionadas ao hospedeiro, como o estado imunológico, por exemplo, estão envolvidos na patogênese da doença (Hanevik et al, 2007, Cotton et al, 2011). As linhagens remanescentes apresentam hospedeiros mais restritos, sendo C e D encontradas em canídeos, E em gado, F em gatos, G em roedores e, a mais recente encontrada, linhagem H, em focas (Thompson & Monis, 2012).

Nos últimos anos, a discussão a respeito da taxonomia de *Giardia* tem sido novamente tomada, uma vez que análises moleculares têm mostrado que as observações dos primeiros taxonomistas estavam corretas. Uma série de espécies foi mais uma vez reconhecida, de acordo com a especificidade de hospedeiro e potencial zoonótico: *G. duodenalis*, antigo genótipo A, infectando seres humanos e uma ampla variedade de mamíferos; *G. enterica*, antigo genótipo B, infectando seres humanos, outros primatas, cães, gatos, e algumas espécies de animais selvagens; *G. canis*, antigos genótipos C/D, infectando cães e outros canídeos; *G. bovis*, substituindo genótipo E, infectando gado e outros animais de casco; *G. cati*, no lugar do genótipo F, infectando felinos e *G. simondi*, ao invés de genótipo G, infectando ratos (Thompson & Monis, 2012). O uso dos diferentes nomes de espécies propostos vem ganhando maior aceitação a cada dia, no entanto, não foi adotado neste trabalho.

### **1.7. Formas Evolutivas**

Os protozoários causadores da giardíase apresentam-se sob duas formas morfológicas distintas: os cistos e os trofozoítos. O cisto, forma infectante da doença, apresenta um formato ovóide, contendo em seu interior, quatro núcleos, um número variável de fibrilas (ou axonemas de flagelos) e corpos escuros no formato de vírgula, que representam primórdios do disco adesivo (Adam 2001). A parede cística é composta de uma camada exterior protofilamentosa e uma camada interna membranosa, formada, principalmente, por carboidratos (principalmente *N*-acetilgalactosamina) e proteínas, que lhe atribuem resistência e proteção às mais adversas alterações de ambiente e temperatura (Aguilar-Díaz et al, 2011).

O trofozoíto, forma morfológica responsável pela manifestação da patologia, apresenta formato de gota, com simetria bilateral, medindo de 12-15 µm de comprimento, 5-9 µm de largura e 1-2 µm de espessura (Carranza & Lujan, 2010). Apresenta um citoesqueleto complexo, responsável pela conservação do formato do parasito e por ancorar os quatro pares de flagelos, emergentes do corpo celular em suas faces anterior, posterior, ventral e caudal, responsáveis por conferir motilidade ao parasito (Ankarklev et al, 2010). Esta forma, é

constituída ainda por dois núcleos, 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 & Benchimol, 2004) sua função ainda é desconhecida. Em sua face ventral, os trofozoítos apresentam uma estrutura única do gênero denominada disco ventral, adesivo ou suctorial, uma organela que possibilita a adesão do parasito a diferentes estruturas, inclusive ao epitélio intestinal do hospedeiro (Palm et al, 2005, Carranza & Lujan, 2010). Esta estrutura está ligada à membrana plasmática por microfibrilas compostas por  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulinas, proteínas contráteis e proteínas do citoesqueleto denominadas giardinas (Palm et al, 2005). Estudos já demonstraram que alterações na composição do disco ventral, diminuem a capacidade e a força de adesão do parasito, comprovando que esta estrutura é indispensável para o mesmo (Woessner & Dawson, 2012). Isso porque, uma vez que os protozoários do gênero *Giardia*, possivelmente, não invadem os tecidos do hospedeiro, o estabelecimento da doença depende em grande parte, da capacidade do trofozoíto em aderir ao epitélio intestinal, sendo assim, o disco ventral é uma organela de suma importância para o sucesso deste processo (Carranza & Lujan, 2010).

### **1.8. Transmissão e Ciclo da Doença**

A transmissão da giardíase ocorre predominantemente de forma indireta, pela ingestão de água ou de alimentos contaminados com cistos viáveis (Adam 2001). No entanto, nos últimos anos, a transmissão direta, pelo contato pessoa-pessoa, tem adquirido grande importância, tornando-se muito comum, principalmente entre indivíduos frequentadores ou residentes de instituições como asilos, creches ou orfanatos, quando as condições sanitárias e de higiene são inadequadas (Abe & Teramoto, 2012). Ademais, casos de transmissão sexual entre homens homossexuais, se tornaram notórios em nações desenvolvidas, como em muitos países da Europa e nos Estados Unidos da América, onde a giardíase já é reconhecida como doença sexualmente transmissível (Shelton 2004, Escobedo et al, 2014).

Após a contaminação com os cistos viáveis pelos hospedeiros susceptíveis, inicia-se então o ciclo biológico do parasito. A elevada resistência da parede cística, que permite a permanência do cisto no ambiente por longos períodos (Aguilar-Díaz et al, 2011), associada à pequena quantidade de cistos necessários para estabelecer a infecção (Araújo et al, 2008),

tornam a contaminação por *Giardia lamblia* bastante provável. Os cistos, que no ambiente encontravam-se em estado de dormência, rapidamente tornam-se metabolicamente ativos, iniciando a excistação (Adam 2001). Pouco é conhecido a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo, entretanto, sabe-se que o gatilho desencadeador para a sinalização intracelular é o meio ácido estomacal (Lauwaet et al, 2007). Em seguida, na primeira porção do intestino delgado, ao entrar em contato com proteases pancreáticas, como a tripsina e a quimiotripsina, ocorre o estímulo final para o rompimento cístico (Aguilar-Díaz 2011). Surge então, o excizoíto, uma forma transitória entre o cisto e o trofozoíto, que difere dessa última pela ausência do disco adesivo e por conter quatro núcleos tetraplóides (Ankarklev et al, 2010). Esta forma intermediária divide-se duas vezes, sem que ocorra replicação do material genético, originando quatro trofozoítos com dois núcleos diplóides, cada (Bernander et al, 2001). Os trofozoítos se replicarão por divisão binária, colonizando rapidamente o intestino delgado, preferencialmente nas porções proximais, como o duodeno (Ankarklev et al, 2010). Para seu desenvolvimento e replicação, os trofozoítos absorvem nutrientes presentes na luz intestinal, sendo a glicose fonte de energia primária, podendo também utilizar aminoácidos e colesterol do hospedeiro (Adam 2001).

Tipicamente, os trofozoítos não invadem o tecido intestinal nem causam ulcerações, habitando apenas no lúmen e nas microvilosidades do intestino (Chin et al, 2002; Troeger et al, 2007; Buret 2008). No entanto, raros relatos das décadas de 60, 70 e 80, tem mostrado trofozoítos no interior da mucosa e submucosa (Brandborg et al, 1967; Saha & Ghosh, 1977; Fleck et al, 1985). Fato este, averiguado recentemente em um relato de caso humano e em modelo animal, demonstrando o potencial invasivo que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar (Martinez- Gordillo et al, 2014; Reynoso-Robles et al, 2015). Apesar disso, quando as condições deixam de ser propícias para o crescimento do parasito, inicia-se o processo de encistamento. É múltipla a natureza do estímulo desencadeador do processo, que leva à expressão de polipeptídeos e síntese de polissacarídeos necessários para a produção da parede cística (Aguilar-Díaz 2011). Desde a década de 90, a privação de colesterol vem sendo adotada como fator suficientemente necessário para induzir a diferenciação dos trofozoítos em cistos, uma vez que o parasito não é capaz de sintetizar colesterol *de novo* (Lujan et al, 1996). No entanto, a alteração do pH, parece ser de extrema relevância (Adam 2001). Os trofozoítos que estão ligados aos enterócitos, estão sob uma camada de muco que mantém o microambiente próximo ao pH neutro. Quando o epitélio intestinal é renovado, os trofozoítos são desprendidos no lúmen intestinal, e deverão se mover vigorosamente contra o peristaltismo para conseguirem se ligar novamente a novos enterócitos. Se não conseguem e

permanecem no lúmen, são expostos a um pH suavemente alcalino que levará ao encistamento (Lauwaet et al, 2007). Além desses fatores, ainda permanece incerto o papel dos ácidos biliares como estímulo para indução dos trofozoítos à sua forma de resistência (Adam 2001, Lauwaet et al, 2007, Carranza & Lujan, 2010). Assim, após se desprender e ser carregado para as porções finais do intestino, ocorre a formação do cisto, que será liberado juntamente com as fezes do hospedeiro infectado, permitindo que o parasito sobreviva fora do hospedeiro, e resista às condições adversas que o ambiente externo lhe proporcionará, perpetuando assim, o ciclo da doença (Carranza & Lujan, 2010).

### **1.9. Manifestações Clínicas e Resposta Imunológica do Hospedeiro**

Geralmente são necessários cerca de 6 a 15 dias após a contaminação, para que o parasito estabeleça a infecção (Hawrelak 2003). As manifestações clínicas entre os indivíduos são de expressão muito variável, podendo apresentar desde casos assintomáticos até casos sintomáticos clássicos (Adam 2001). Além disso, por razões pouco claras, alguns indivíduos podem desenvolver sequelas crônicas, incluindo déficit cognitivo e de crescimento (Niehaus et al, 2002; Berkman et al, 2003), síndrome do intestino irritável pós-infecção e fadiga crônica (Hanevik et al, 2014), além de complicações extra-intestinais (doenças oculares, artrite, alergias e miopatias), mesmo após a eliminação completa do parasito (Halliez & Buret, 2013).

A variação nas manifestações clínicas procede de causas multifatoriais, envolvendo tanto fatores relacionados ao hospedeiro, como ao parasito (Cotton et al, 2011) e ainda, pode diferir conforme as regiões geográficas (Hollm-Delgado et al, 2008; Ward 2009; Siwila et al, 2010). A linhagem da espécie de *Giardia* pode influenciar muito na gravidade da doença. Em estudos realizados na década de 80, com voluntários humanos, foi observado maior sintomatologia da giardiase naqueles infectados com a cepa axênica GS/M, pertencente à linhagem B o que, posteriormente, fora novamente reproduzido experimentalmente em roedores (Nash et al, 1987; Byrd et al, 1994). Em modelos *in vitro*, já se demonstrou também que as alterações nas células epiteliais são dependentes da cepa (Chin et al, 2002) e que, o co-cultivo de duas linhagens causou mais apoptose celular e rompimento das junções firmes do que as linhagens A ou B isoladas (Koh et al, 2013). Em humanos, apesar das tentativas de se associar a sintomatologia à uma linhagem específica, os resultados tem sido inconclusivos (Pestechian et al, 2014; Puebla et al, 2014). Uma justificativa para este fato é a possibilidade de infecções heterólogas ou até mesmo a recombinação inter-linhagens, demonstrado pela

proporção substancial de amostras com resultados mistos encontradas em estudos que utilizam genotipagem *multilocus* (Laishram et al, 2012; Broglia et al, 2013).

Em indivíduos sintomáticos, a infecção pode causar desidratação, cólica e inchaço abdominal, má digestão, má absorção, diarreia secretória, explosiva e fétida às vezes com eliminação de gordura (esteatorréia) e, conseqüentemente, perda de peso (Buret 2008). Apesar dos estudos histológicos da mucosa do intestino delgado, muitas vezes não demonstrarem nenhuma anormalidade aparente, o aumento de infiltrados linfocitários e a diminuição da razão vilosidade:cripta foram descritos em algumas crianças (Koot et al, 2009), além da presença de inflamação em alguns adultos tanto na infecção aguda (Hanevik et al, 2007) como na crônica (Troeger et al, 2007).

A forte ligação entre lectinas presentes na superfície da *Giardia* e carboidratos presentes na superfície das células epiteliais, pode levar à apoptose de enterócitos e à perda de função da barreira intestinal, especialmente nos indivíduos com giardíase crônica, que não foram diagnosticados e tratados adequadamente (Chin et al, 2002; Panaro et al, 2007; Jenkins et al, 2009). As células epiteliais estão unidas em sua parte apical pelas junções firmes, que impedem o influxo de antígenos por vias paracelulares. As proteínas das junções firmes, como as claudinas e ocludinas, estão ligadas às zônulas de oclusão (ZO), que são pontes para o citoesqueleto de actina e filamentos de miosina. A passagem anormal de microrganismos e de seus produtos pela camada epitelial, devido a alterações das junções firmes, está associada a diversos estados de doença, incluindo a giardíase (Yu et al, 2012). A manutenção da barreira epitelial do hospedeiro durante a giardíase, varia de acordo com a cepa e, apesar de algumas infecções não causarem alterações nestas junções, muitas causam rompimento de componentes do complexo juncional apical (incluindo F-actina, ZO-1, claudina-1, e  $\alpha$ -actina), resultando em aumento da permeabilidade intestinal (Teoh et al, 2000; Scott et al, 2002; Cotton et al, 2011). Concomitantemente, a desregulação na apoptose das células epiteliais do intestino, durante a giardíase em humanos, também contribui para os prejuízos na barreira da mucosa (Troeger et al, 2007). Diferentes cepas de *Giardia* tem apresentado variáveis funções na indução da apoptose de enterócitos, sendo que atividades proteolíticas do parasito estão envolvidas neste processo (Chin et al, 2002). Quando a perda de função da barreira intestinal ocorre, há aumento da permeabilidade intestinal e encurtamento difuso das microvilosidades epiteliais, que poderá levar à redução na secreção de dissacaridases (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010) e hipersecreção de ânions, contribuindo com os prejuízos na absorção de lipídeos (Bansal et al, 2005), vitaminas lipossolúveis (Saki et al, 2011), zinco e ferro (Demirci et al, 2003), vitamina B12, sódio (Buret 2008) e demais manifestações clínicas da doença

(Jimenez 2004; Buret 2008; O'Hara & Buret, 2008; Koot et al, 2009). Além disso, o aumento do peristaltismo intestinal, resultante da degranulação de mastócitos (Li et al, 2007) ou da má absorção de nutrientes e eletrólitos, que cria um gradiente osmótico atraindo água para o lúmen intestinal (Troeger et al, 2007), também pode contribuir com as manifestações clínicas observadas na giardíase.

Além da degradação de proteínas envolvidas nas junções epiteliais causadas direta ou indiretamente pela *Giardia* (Cotton et al, 2011), que contribue para os danos na doença, a competição por nutrientes entre o parasito e as próprias células epiteliais, pode gerar prejuízos à mucosa. Estudos in vitro demonstraram que o parasito é capaz de consumir a arginina luminal, ao ponto de suprimir o ciclo celular das células intestinais (Stadelmann et al, 2013). Além disso, como forma de escape da defesa imunológica do hospedeiro, os trofozoítos de *G. lamblia* utilizam as enzimas arginina deaminase (ADI) e ornitina carbamil transferase (OCT) no metabolismo de arginina, esgotando-a do meio, impedindo a produção de óxido nítrico. No entanto, uma vez que a depleção de arginina pode induzir a apoptose em linhagens de células humanas, esse mecanismo é sugerido como uma das maneiras de indução da apoptose desencadeada diretamente pelo parasito (Ringqvist et al, 2008). Considerando-se que as células epiteliais utilizam arginina para crescimento, este fato explicaria porque em situações que levam à escassez deste nutriente, como a desnutrição protéica, há aumento da susceptibilidade ao encurtamento das vilosidades durante a infecção por *Giardia* (Ventura et al, 2013). Tem sido demonstrado também que as infecções por *Giardia lamblia* iniciam a sinalização apoptótica extrínseca, via ativação da caspase-8, que ocorre após a ativação de caspase-6 e 3 (Panaro et al, 2007). No entanto, ainda é necessário mais estudo para determinar se a ativação da caspase-8 na giardíase é direta e/ou ocorre devido à ativação caspase-6 e-3. Como resultado do aumento da permeabilidade das membranas resultante da apoptose, há liberação de citocromo c, que por sua vez ativa as caspase-9 e -3, subsequentemente (Slee et al, 1999). Assim, a diarreia que ocorre durante a infecção é provavelmente o resultado de uma disfunção da barreira epitelial, que causa má absorção de nutrientes e hipersecreção de ânions (Buret et al, 1992; Troeger et al, 2007).

Neste contexto, deve-se ressaltar que o sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel fundamental nas várias manifestações da giardíase (Eckmann 2003). A resposta imune do hospedeiro nesta doença é complexa e tem sido extensivamente revisada, produzindo avanços significativos na compreensão das respostas inata e adaptativa contra o parasito (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010; Cotton et al, 2011; Lopez-Romero et al, 2015). O sistema imune inato é a primeira e mais rápida linha de defesa não específica contra



a colonização por patógenos. Ao colonizar as porções mais proximais do intestino delgado (duodeno e jejuno), um ambiente hostil para a sobrevivência de microorganismos, devido às altas concentrações de enzimas digestivas e bile, a *Giardia* se depara com as primeiras barreiras encontradas para sua colonização (Eckmann 2003). Para proteger as células epiteliais destas enzimas digestivas, há a secreção de muco pelas células caliciformes epiteliais intestinais que, além disso, impedem o acesso de agentes patogênicos, incluindo a *Giardia*, ao epitélio (Roxström-Lindquist et al, 2006; Solaymani-Mohammadi & Singer 2010). Somado a isso, há o fato de que as células intestinais se renovam a cada 3-5 dias, fazendo com que a *Giardia* deva, constantemente, desaderir e aderir ao epitélio, evitando ser aprisionada pelo muco, como também, eliminada pelo movimento peristáltico (O'Hara & Buret 2008).

A microbiota intestinal também deve ser considerada uma obstáculo contra a infecção por *Giardia*, uma vez que pode limitar o crescimento do parasito por meio de diversos mecanismos, incluindo a concorrência por nutrientes, a liberação de substâncias inibitórias, a toxicidade direta e a indução de respostas imunológicas (Berrilli et al, 2012). Estudos em modelos experimentais tem demonstrado que o uso prévio ou concomitante de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*) na infecção por *Giardia*, aumentou significativamente a produção de enzimas anti-oxidantes e de dissacaridasas intestinais (Goyal et al, 2013). Além disso, o uso destes microrganismos restaurou a morfologia do intestino, reduzindo a gravidade e duração da giardíase (Shukla et al, 2012; Goyal et al, 2013). Com isso, sugere-se que a microbiota comensal não só tem um efeito anti-*Giardia*, mas também protege e preserva a integridade do intestino durante a infecção (Goyal & Shukla, 2013). Sendo assim, diferenças na composição de espécies microbianas entre indivíduos poderiam explicar a variabilidade na manifestação da doença e na susceptibilidade à infecção por *Giardia lamblia* (Solaymani-Mohammadi & Singer 2010).

Concomitantemente às barreiras mecânicas descritas, as barreiras químicas, como os peptídeos antimicrobianos (PAM) e o óxido nítrico, também estão envolvidas na defesa do hospedeiro na giardíase (Lopez-Romero et al, 2015). Os PAM, pequenos peptídeos com amplo espectro de atividades microbicidas, são produzidos por várias células hospedeiras, incluindo as células de Paneth e classificados de acordo com sua estrutura, em defensinas, catelicidinas e histaminas (Ayabe et al, 2004). Estudos demonstraram que as defensinas derivadas de células de Paneth e a catelicidina de neutrófilos poderiam reduzir a viabilidade dos trofozoítos de *Giardia* (Aley et al, 1994; Ayabe et al, 2004). O óxido nítrico (NO) é produzido enzimaticamente a partir da L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase, que pode

existir em três isoformas diferentes: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e indutível (iNOS), sendo a última, a mais expressa pelas células epiteliais intestinais, induzida por citocinas e produtos microbianos (Eckmann 2003). Já foi relatado que pacientes infectados com *Giardia* apresentam aumento dos níveis de NO (Matowicka-Karna et al, 2011), sendo este composto responsável tanto pela inibição do processo de excitação como também pela indução de um efeito citostático sobre os trofozoítos de *G. lamblia*, como demonstrado em estudos *in vitro* (Eckmann et al, 2000). No entanto, apesar dos potenciais efeitos do NO nos trofozoítos, o parasito desenvolveu estratégias para evasão deste mecanismo de defesa do hospedeiro, consumindo a arginina, como já descrito anteriormente (Eckmann et al, 2000; Ringqvist et al, 2008) e, assim, inibindo a produção de iNOS pelas células epiteliais intestinais (Stadelmann et al, 2013),

Além das barreiras relatadas, algumas células do sistema imune inato podem atuar direta ou indiretamente contra *G. lamblia*. Os mastócitos, atualmente reconhecidos como células efetoras da resposta imunitária contra vários parasitos, desempenham um papel significativo na resposta imune protetora contra a *Giardia*, principalmente pela síntese de IL-6, uma vez que esta citocina promoverá a diferenciação das células B em plasmócitos, conduzindo ao desenvolvimento de respostas humorais de IgA (Merluzzi et al, 2010). Além disso, a degranulação dos mastócitos, promovendo a contração muscular, pode agir em sinergismo com o óxido nítrico, induzindo o peristaltismo (Li et al, 2007).

Muitas outras células podem estar envolvidas na resposta imune na giardíase, apesar de pouco se saber sobre o seu envolvimento durante a doença, como as células M, captadoras seletivas de macromoléculas, especializadas em carrear antígenos do lúmen intestinal para os tecidos linfóides dentro da mucosa (Blumberg et al, 1999). Estas células poderiam transportar antígenos específicos de *Giardia* para placas de Peyer, incitando a ação de linfócitos T e B. Assim como as células M, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos também não tem sua função plenamente determinada contra *Giardia*. Alguns estudos descreveram um ligeiro aumento na população de macrófagos na lâmina própria de camundongos infectados, considerando-os possíveis células reguladoras (Maloney et al, 2015). Já em relação aos neutrófilos, o aumento do infiltrado foi observado como consequência indireta da invasão microbiana para a mucosa, em modelo experimental (Chen et al, 2013).

Em contrapartida, as células dendríticas (DC, do inglês *Dendritic Cells*), desempenham papel extremamente importante no controle da giardíase, sendo consideradas um elo entre a resposta imune inata e adaptativa. Estas células expressam proteínas das junções-firme,

permitindo estabelecer ligações com células endoteliais intestinais, estendendo seus prolongamentos celulares para o lúmen intestinal, o que possibilita que antígenos específicos de *Giardia* sejam detectados (Rescigno et al, 2001). Uma vez ativadas, as DC podem ainda supra-regular a expressão de proteínas das junções firmes, permitindo a abertura das junções firmes para sua passagem e migração para outros locais como os nódulos linfáticos de drenagem, levando à indução de mecanismos imunes adaptativos (Castro-Sanchez & Martin-Villa 2013). Uma vez que a *Giardia*, possivelmente, não invade epitélios, essa seria uma explicação plausível para a capacidade de que o parasito possui em induzir anticorpos locais e sistemicos, além da resposta das células T (Jimenez et al, 2004). Além disso, a presença do protozoário pode ativar a maturação das DC, levando à liberação de citocinas imunomoduladoras (Lee et al, 2014). Dentre elas, a mais importante a se destacar é a IL-6, uma citocina pró-inflamatória que induz respostas celulares inatas e também medeia a ativação de células B em células IgA secretórias e de células T em células Th17 (Kimura et al, 2007; Scheller et al, 2011). Camundongos deficientes em IL-6 não são capazes de eliminar o parasito, além de apresentarem respostas das citocinas intestinais alteradas, mesmo com níveis normais de IgA (Bienz et al, 2003). Embora haja muitas fontes dessa citocina, a IL-6 derivada das DC é fundamental para a eliminação da *Giardia*, provavelmente porque a produção inicial de IL-6 por DC é importante para a diferenciação de células T, sendo a presença de IL-6 durante o contato inicial entre DC e células T, um determinante chave do tipo de resposta que se segue (Kamda et al, 2012).

Além de IL-6, outras citocinas também parecem estar envolvidas na resposta imune na giardíase. A IL-17 tem sido demonstrada como uma citocina essencial para supressão da infecção, como foi observado em um estudo no qual camundongos knockout para o receptor da citocina (IL-17RA), foram incapazes de eliminar o parasito (Dreesen et al, 2014). Sugere-se que a IL-17 atue sinergicamente com IL-6 no desenvolvimento das células TCD4<sup>+</sup> Th17, desencadeando os primeiros mecanismos imunes adaptativos (Grit et al, 2014; Dreesen et al, 2014). Por mecanismos ainda desconhecidos, o TNF- $\alpha$  também parece ser importante para eliminar o parasito, uma vez que camundongos deficientes desta citocina retardaram a eliminação do patógeno (Zhou et al, 2007). Apesar de elevados em alguns modelos de infecção (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011), o IFN- $\gamma$  e a IL-4 não parecem ser absolutamente necessários para depurar a *Giardia*, tendo em vista que já foi certificado que camundongos deficientes nestas citocinas foram capazes de eliminar o parasito normalmente (Singer & Nash, 2000). No entanto, em humanos, níveis séricos elevados de IFN- $\gamma$ , IL-4, bem como IL-5, foram correlacionadas com maior duração da infecção por *G. lamblia*,

enquanto níveis elevados de IL-8 foram associados com infecções mais curtas (Long et al, 2010). A elevação de outras citocinas circulantes, como IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-22 e IL-23 também já foi reportada, tanto em humanos como em animais (Bayraktar et al, 2005; Kamda & Singer, 2009; Matowicka-Karna et al, 2009; Matowicka-Karna et al, 2011; Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011; Obendorf et al, 2013; Jimenez et al, 2014).

Se os mecanismos da imunidade inata não são capazes de eliminar o patógeno, sua permanência no hospedeiro irá desencadear então a resposta imune adaptativa. Tanto a resposta imune humoral como a celular desempenham importante papel na eliminação da *Giardia*. Estudos efetuados em humanos e em modelos experimentais demonstraram que infecções secundárias, após a exposição inicial ao parasito, levaram ao desenvolvimento de imunidade ou a um menor grau de dano patológico ao epitélio (Solaymani-Mohammadi & Singer 2010).

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que a participação das células T estaria associada à contenção da progressão da doença, uma vez que a depleção de células T CD4<sup>+</sup> em animais resultou em giardíase crônica (Hanevik et al 2011). Sugere-se que as células TCD4<sup>+</sup> possam agir cooperativamente induzindo a ativação de células B e a maturação e diferenciação de plasmócitos, para produzir imunoglobulinas específicas e mais eficientes (Singer & Nash 2000; Lopez-Romero et al, 2015). Além de participarem efetivamente na eliminação do parasito, as células T estão também associadas com o processo patológico nas membranas apicais de enterócitos durante a giardíase. A ativação de linfócitos intraepiteliais, formados principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, está relacionada com a lesão tecidual na mucosa intestinal, contribuindo ainda mais com o encurtamento difuso das microvilosidades da borda em escova e com a síndrome de má absorção, por mecanismos não totalmente elucidados, mas que envolvem seus efeitos citotóxicos (Scott et al, 2000, 2004; Troeger et al, 2007). Sendo assim, enquanto as células TCD4<sup>+</sup> são importantes mediadores na eliminação da *Giardia*, as células T CD8<sup>+</sup> estão envolvidas com a imunopatologia da doença, indicando que as células T desempenham um papel duplo durante a giardíase.

Mesmo diante das evidências sobre o papel das células T na proteção imunológica contra a giardíase, observações clínicas sugerem que a resposta humoral é essencial. Grande parte dos estudos realizados em modelos experimentais sugere que a principal defesa do organismo hospedeiro contra o parasito é a produção de imunoglobulina A (IgA), que provocaria o desprendimento dos trofozoítos do epitélio, deslocando-os com o peristaltismo, ao invés de ocasionar sua morte direta (Eckmann 2003). Em pacientes portadores de imunodeficiência variável comum (hipogamaglobulinemia), foi encontrada maior prevalência de cistos de

*Giardia* e maior sintomatologia do que naqueles com deficiência de linfócitos T (com aplasia avançada do timo ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (Oksenhendler et al, 2008). Também foi observado que, em crianças, a deficiência de respostas de IgA está relacionada com diarreia e infecções persistentes por *Giardia* (Char et al, 1993). Em modelos animais, os resultados de infecções experimentais demonstram que a maior parte dos genes expressos nas análises de mRNA, está relacionada com a produção de anticorpos (Tako et al, 2013), ao mesmo tempo que camundongos *knockout* para IgA, apresentaram dificuldade em eliminar o parasito.

Portanto, o controle da giardíase pelo hospedeiro, envolve inicialmente barreiras químicas e mecânicas e em seguida, a resposta imune celular equilibrada, incluindo a liberação de citocinas, assim como a resposta humoral da mucosa e anticorpos específicos contra antígenos do parasito.

### **1.10. Modelo Experimental**

O estudo dos mecanismos pelos quais a obesidade induz disfunções fisiológicas pode ser facilitado pela utilização de modelos animais, especialmente roedores, devido à grande similaridade e homologia entre os genomas destes com seres humanos (Panchal & Brown, 2011; Nilsson et al, 2012). Atualmente, numerosos modelos experimentais de obesidade são descritos na literatura, devido à mutações genéticas, neuroendócrinas ou dietéticas (Von Diemen et al, 2006). A escolha do melhor modelo depende do objetivo do estudo, sendo os principais utilizados, os modelos genéticos ou alimentares. As alterações genéticas podem ser classificadas como monogênicas e são devidas a mutações nos tecidos periféricos. Estes modelos são particularmente importantes quando existem genes homólogos no homem (Marques-Lopes et al, 2004). Camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) e deficientes do receptor de leptina (*db/db*) são amplamente utilizados para estudos de obesidade e diabetes tipo II, demonstrando resistência à insulina, hiperleptinemia, hiperfagia e níveis extremamente elevados de glicose no plasma, a partir de 6-10 semanas de idade (Zhang et al, 1994). Outro modelo animal que apresenta alterações genéticas no gene do receptor de leptina é o rato obeso Zucker (*fa/fa*) (Phillips et al, 1996). Este rato é hiperfágico e apresenta um gasto energético reduzido, deposição preferencial de lípidos no tecido adiposo, levando ao desenvolvimento de uma obesidade pronunciada numa fase inicial da vida (White & Martin, 1997). No entanto, estes animais têm níveis glicêmicos normais e não desenvolvem diabetes evidente (Artiñano & Castro, 2009). Outro modelo amplamente utilizado são os camundongos

com uma mutação no cromossomo que sintetiza o peptídeo relacionado com a proteína agouti (AGRP), uma proteína que atua tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto nos tecidos periféricos para induzir obesidade. No SNC, esta proteína antagoniza o receptor de melanocortina neural, resultando em obesidade, hiperfagia e hiperinsulinemia enquanto na periferia, a expressão de agouti no tecido adiposo resulta em ganho de peso significativos em ratos (Michaud et al, 1997).

Modelos animais monogênicos de obesidade são úteis porque sua obesidade e adiposidade são frequentemente graves, resultando em um fenótipo distinto, o que pode ser extremamente relevante para certos aspectos da pesquisa sobre obesidade, como a avaliação dos efeitos de drogas (Hinney, Vogel & Hebebrand, 2010). Entretanto, considerando-se que a taxa de obesos no mundo vem aumentando, e que a doença tem etiologia multifatorial, sugere-se que os fatores ambientais ou comportamentais, como a alimentação, sejam os principais contribuintes para a epidemia, ao invés de alterações genéticas (Buettner et al, 2007). Visto que o modelo experimental utilizado deve mimetizar, o mais próximo possível, a doença em humanos, modelos animais de obesidade induzida por dieta tem sido preferencialmente utilizados (Rosini et al, 2012).

A obesidade induzida pela dieta em roedores pode ser obtida de diferentes maneiras, com grande variação tanto em relação ao conteúdo da dieta quanto às espécies de roedores utilizadas (West, Wagspack & McCollister, 1995). A maioria dos roedores tende a tornar-se obesa em dietas ricas em gordura, mas há respostas variáveis no ganho de peso, tolerância à glicose, resistência à insulina, triglicérides e outros parâmetros dependendo da tensão. Os camundongos C57B16/J são considerados propensos à obesidade e são uma das cepas de roedores mais comumente utilizadas para obesidade induzida pela dieta, apresentando acentuado aumento de peso, hiperinsulinemia e hiperglicemia (Panchal & Brown, 2011). Outros roedores, como os ratos Wistar e Sprague-Dawley, também são suscetíveis à obesidade induzida pela dieta e popularmente usados na pesquisa, já que ganham peso rapidamente em dietas ricas em gordura (Rosini et al, 2012). Os ratos Sprague-Dawley, especialmente, foram estudados pela sua capacidade de mostrar uma resposta variável a uma dieta rica em gordura, uma vez que alguns animais ganham peso rapidamente enquanto outros ganham apenas tanto peso como os alimentados com uma dieta com baixo teor de gordura (Madsen et al, 2010), permitindo o estudo de animais naturalmente propensos e resistentes à obesidade. Muitos estudos têm tentado induzir a obesidade em animais de laboratório, aumentando apenas a ingestão de alimentos, o que levaria ao ganho de peso e obesidade. No entanto, o aumento da densidade calórica pelo aumento na ingestão de certos macronutrientes,

como gorduras e carboidratos, resultando em maior ingestão calórica total, é mais eficiente para desencadear a doença. Dietas ricas apenas em carboidratos têm sido usadas para desenvolver obesidade em ratos, mas a associação entre carboidratos e gorduras, ou apenas gorduras, têm mostrado efeitos mais deletérios em animais (Sato-Mito et al, 2009). Estas dietas ricas em gordura e carboidratos (frutose ou sacarose), mimetizam melhor a dieta humana, resultando em um efeito semelhante sobre o peso corporal, gordura abdominal, hiperinsulinemia e hiperglicemia, levando à síndrome metabólica (Surwit et al, 1995; Mito et al, 2009). É importante ressaltar que a fonte de gordura na dieta pode resultar em pequenas diferenças nos fenótipos, uma vez que manifestações mais pronunciadas de obesidade e resistência à insulina são observadas quando a fonte de gordura contém quantidades substanciais de gordura saturada e gordura monoinsaturada, como a banha, por exemplo (Krishnan & Cooper, 2014).

Dentre os modelos experimentais propostos para estudar o desenvolvimento e a patogenia da infecção por *G. lamblia*, os gerbils da espécie *Meriones unguiculatus* permitem obter bons resultados devido ao tamanho, facilidade de manipulação, susceptibilidade à infecção e principalmente devido à semelhança entre o padrão de desenvolvimento da giardíase com o padrão estabelecido em humanos (Eckmann, 2003; Araújo et al, 2008). O gerbil é um modelo já difundido em muitas partes do mundo e bem estabelecido para o estudo de diversos agravos como gastrite e câncer gástrico induzidos pela infecção por *Helicobacter pylori* (Kodama et al, 2004; Júnior et al, 2016), doenças auditivas (Abbas & Rivolta, 2015), e mais recentemente, para estudo da visceralização de *Leishmania major* (Bakirci et al, 2015). Estudo desenvolvido em nosso laboratório confirmou que o gerbil é um bom modelo para o desenvolvimento da giardíase, permitindo o estudo da associação da doença com a desnutrição (Ventura et al., 2013).

Entretanto, não há relatos na literatura de estudos apresentando esta espécie de roedor, *Meriones unguiculatus*, como modelo experimental para o estudo da obesidade, associada ou não com a giardíase, e das alterações metabólicas decorrentes da ingestão de dieta rica em gorduras e açúcares. A ocorrência de obesidade espontânea na espécie *Meriones unguiculatus* de gerbils foi relatada há várias décadas, quando os pesquisadores observaram que 10% dos animais se tornaram obesos e apresentaram alterações metabólicas, mesmo quando alimentados com dieta padrão (Vincent et al, 1979). Outras espécies de ratos do deserto, ou gerbils, podem também desenvolver a obesidade quando sua dieta típica é mudada para alimentação laboratoriais padrão, tal como *Psammomys obesus* (Khalkhal et al, 2012) sendo que alguns estudos já abordaram transtornos metabólicos e imunológicos relacionados à

obesidade neste modelo de animais naturalmente obesos (Xu, Liu & Wang, 2011; Liu, Xu & Wang, 2012). Estudando a espécie de gerbil do deserto *Gerbillus gerbillus*, Semiane et al (2016), descobriram que o consumo de uma dieta rica em carboidratos induz distúrbios metabólicos e danos no fígado, que caracterizam a esteatohepatite não-alcoólica, sugerindo que este roedor pode representar um bom modelo para estudo de doenças metabólicas humanas. Já Li et al (2016) estabeleceram uma linha de gerbils espontaneamente diabéticos com resistência à insulina e resistência à leptina bem como diminuição do nível de adiponectina no soro. Apesar de todos estes trabalhos associando obesidade e seus agravos metabólicos às diferentes espécies de gerbils, não existem estudos que induzam obesidade pela dieta rica em gorduras e carboidratos simples na espécie *Meriones unguiculatus*, comparando-os com animais alimentados com dieta padrão de laboratório. Assim, procurou-se investigar as alterações metabólicas em gerbils, resultantes de uma dieta rica em gorduras e açúcares simples, padrão alimentar que está mais próximo das mudanças dietéticas da dieta ocidental moderna.



## 2. JUSTIFICATIVA

O mundo vem experimentando nas últimas décadas uma nova epidemia, a da obesidade. O aumento indiscriminado na ingestão de alimentos ricos em gordura e açúcares, além de um aumento na inatividade física, trouxe consigo uma série de agravos à saúde da população. Embora seus efeitos sobre o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares sejam bem definidos, muito pouco se sabe sobre o impacto da obesidade sobre a função imunológica em doenças infecciosas. A expansão do tecido adiposo pode causar efeitos deletérios nos indivíduos obesos causando ainda, aumento de risco e piora do prognóstico para diversas infecções bacterianas e virais. Nos últimos anos, tem surgido estudos que buscam esclarecer qual o impacto da adiposidade também nas infecções parasitárias. Considerando-se que a biologia, local de infecção e tipo de resposta imunológica desencadeada pelos parasitos é bastante distinta, os estudos tem mostrado interações também bastante divergentes entre parasitos e adiposidade excessiva. Entretanto, ainda não existem estudos sobre a associação entre obesidade e giardíase, infecção parasitária mais frequente em países desenvolvidos e com elevada prevalência em países em desenvolvimento. Uma vez que a prevalência da obesidade e da giardíase se sobrepõe em diversas áreas, é importante que se elucide se esta parasitose, até então não-invasiva e muitas vezes auto-limitante, poderia ser influenciada pelas debilidades na resposta imunológica já estabelecida em hospedeiros obesos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Geral*

Verificar se as alterações metabólicas e imunológicas decorrentes da obesidade induzida pela dieta rica em açúcares simples e lipídeos em gerbils, influenciam no processo infeccioso por *Giardia lamblia*, atenuando ou acentuando a infecção e suas consequências.

#### 3.2. *Específicos*

- Estabelecer o gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental para estudo da obesidade;
- Comparar os gerbils obesos e não obesos, infectados ou não infectados pelo parasito *G. lamblia* quanto a:
  - Evolução da obesidade e consumo alimentar;
  - Alterações do metabolismo;
  - Intensidade do parasitismo e das lesões duodenais e hepáticas;
  - Estresse oxidativo gerado no epitélio intestinal e no fígado;
  - Perfil de células do sistema imune no intestino delgado, tecido adiposo epididimal e baço;
  - Presença de estruturas semelhantes a coroa no tecido adiposo epididimal;
  - Quantidade e tipo de tipo de lipídeos depositados no fígado e excretados no conteúdo fecal.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Para este estudo foram utilizados 42 gerbils (*Meriones unguiculatus*), machos, com idade média de 25 semanas. Os gerbils foram obtidos no Biotério do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério do Laboratório de Amebíase e Protozooses Intestinais, durante todo o período experimental em gaiolas coletivas, sob controle de temperatura e fotoperíodos de 12h (7:00–19:00), com livre acesso à água filtrada e à dieta. Os gerbils permaneceram durante uma semana recebendo dieta comercial para aclimação no novo ambiente. Além disso, cada animal recebeu 0,1mL (10ug) de Ivermectina 1% solução injetável, por via subcutânea, para assegurar que os mesmos estivessem livres de qualquer parasitose. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 136/13).

### **4.2. Delineamento *experimental e coleta de tecidos***

Os gerbils foram identificados individualmente e divididos de forma homogênea quanto ao peso corporal em dois grupos de 21 gerbils cada. O grupo Controle CT, recebeu a dieta padrão AIN-93 (Reeves et al, 1993), com densidade calórica de 4,15 kcal/g e composta por 68%, 7% e 20% de calorias totais provenientes de carboidratos, lipídeos e proteínas, respectivamente. Já o grupo Hiper (HP), recebeu dieta rica em açúcares e gordura para indução da obesidade, com densidade calórica de 5,86 kcal/g e composta por 42%, 37,5% e 20% de calorias totais provenientes de carboidratos, lipídeos e proteínas, respectivamente. A composição de ácidos graxos na dieta foi calculada com base nos dados de Silva & Gioielli, 2006, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1. Composição em nutrientes das dietas experimentais.**

Ingredientes	Quantidade (g/kg)	
	Controle	Hiper
<i>Caseína</i>	200	200
<i>Amido de milho</i>	<b>397,5</b>	<b>62</b>
<i>Sacarose</i>	<b>100</b>	-
<i>Maltodextrina</i>	<b>132</b>	-
<i>Groselha</i>	-	<b>310</b>
<i>Banha de Porco</i>	-	<b>355</b>
<i>Óleo de soja</i>	<b>70</b>	<b>20</b>
<i>Celulose</i>	50	50
<i>Mistura mineral</i>	35	35
<i>Mistura vitamínica</i>	10	10
<i>Bitartarato de Colina</i>	2,5	2,5
<i>Butil-hidroxi tolueno(BHT)</i>	0,014	0,014
<i>Metionina</i>	3	3
<b>Densidade Calórica (kcal/g)</b>	<b>4,15</b>	<b>5,86</b>
Composição de ácidos graxos, g/100 g		
Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)	22.10	42.32
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)	60.74	15.15
Ácidos graxos saturados (SFA)	16.93	42.51
Razão insaturados/saturados (UFA/SFA)	<b>4.89</b>	<b>1.35</b>

Após 10 semanas de experimento, quando concluiu-se a indução da obesidade nos animais do grupo Hiper, os 21 gerbils do grupo CT foram divididos de forma homogênea quanto ao peso corporal em três grupos com sete animais cada: controle sem infecção (CT), controle que permaneceu infectado por 1 semana (CTIN) e controle que permaneceu infectado por 2 semanas (XCTIN). Os 21 gerbils do grupo Hiper também foram divididos em obeso sem infecção (OB), obeso que permaneceu infectado por 1 semana (OBIN) e obeso que permaneceu infectado por 2 semanas (XOBIN), com 7 gerbils em cada grupo. Logo após a divisão, os gerbils dos grupos CTIN, XCTIN, OB e XOBIN, foram infectados com os trofozoítos de *Giardia Lambli*a.

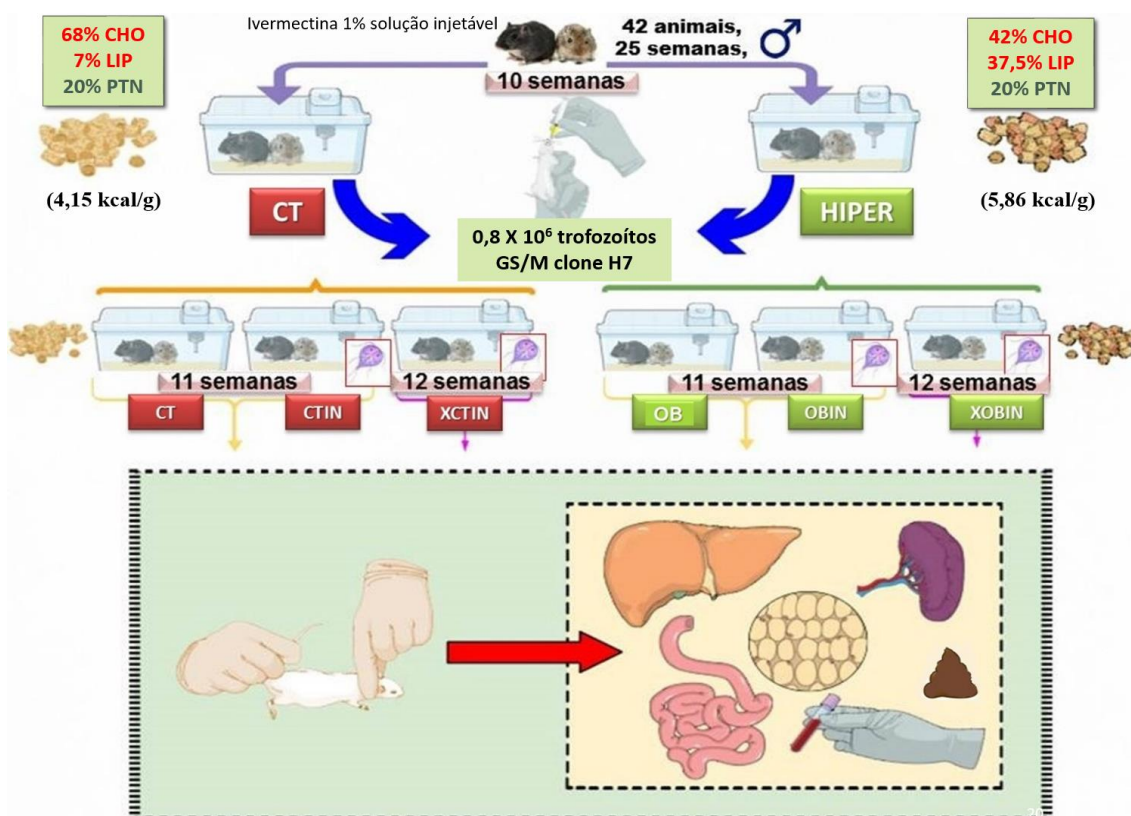
Para infecção dos animais, os parasitos utilizados foram trofozoítos da cepa GS/M clone H7 (ATCC 50581), mantidos em cultura axênica e cultivados em meio TYI-S-33, modificado por Keister (1983) e suplementado com bile bovina. Tubos de cultura contendo trofozoítos mantidos em estufa a 37°C, foram colocados em banho de gelo por 15 minutos

para o desprendimento dos parasitos da parede dos tubos. Após este período, 25 µL do meio de cultura foram adicionados a um microtubo contendo 75 µL de corante vital (eosina 0,125%). Após homogeneização, a solução foi colocada na câmara de Neubauer para contagem, considerando-se apenas os quatro maiores quadrantes. A concentração obtida foi diluída em meio de cultura, livre de trofozoítos, obtendo-se a concentração final de  $0,8 \times 10^6$  trofozoítos/mL, em um volume de 800 µl. Os gerbils foram inoculados por gavagem, com o auxílio de uma cânula DELVO nº 15, acoplada a uma seringa de 1 mL, conforme as recomendações do CEUA. Os grupos CT e OB, passaram pelo mesmo procedimento, no entanto, a estes gerbils foi inoculado meio de cultura livre de parasitos.

A duração total do experimento foi de 11 semanas para os grupos CT, CTIN, OB e OBIN, e de 12 semanas para os grupos XCTIN e XOBIN. No final destes períodos, após jejum de 12h, os gerbils foram eutanaziados sob anestesia com solução de Ketamina (100 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg), para retirada do sangue, e posterior deslocamento cervical. O jejum é necessário uma vez que a ingestão de alimentos (que ocorre principalmente à noite, em roedores) interfere em certas determinações bioquímicas como perfil lipídico, glicose, insulina e leptina, além de manter intestino e fígado livres de influência de alimentos. Imediatamente após a eutanásia, foram coletados: sangue, intestino delgado, tecidos adiposos (perirrenal, epididimal e mesentérico), fígado, conteúdo fecal (diretamente do cólon distal) e baço.

Inicialmente, o sangue foi coletado pela artéria axilar e colocado em microtubos, centrifugado a 6000 RPM por 10 minutos para separação do plasma, e armazenado a -70°C até a utilização para dosagens bioquímicas (proteínas totais, albumina, triglicérides, colesterol total, glicose, leptina e citocinas). Após deslocamento cervical, o baço dos gerbils foi coletado em condições estéreis e colocado em placas com meio de cultura de células. Em seguida, foi feita uma abertura longitudinal na cavidade abdominal para coleta dos demais tecidos. O intestino delgado foi coletado inteiramente, sendo a primeira porção do duodeno ( $\pm 5$ cm) destinada à análise histopatológica. Este fragmento foi fixado em solução de Bouin, onde permaneceu por 24 horas e posteriormente, adicionado à solução de formol a 10% tamponado. Uma segunda parte ( $\pm 0,5$ cm) foi separada e armazenada a -70°C, para dosagem de citocinas do homogenato de tecido e para análise do estresse oxidativo. O restante foi macerado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para pesquisa direta de parasitos. O tecido adiposo foi coletado, pesado separadamente e pequenas frações do tecido adiposo epididimal ( $\pm 1$ cm) foram separadas para análise histológica (sendo então fixada em solução de formol a 10%) ou para dosagem de citocinas do homogenato de tecido, sendo portanto

acondicionada em microtubos e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a utilização. O fígado foi separado, pesado e pequenas frações do lobo direito ( $\pm 1\text{cm}$ ) foram separadas para análise histológica (fixada em solução de formol a 10%), ou para extração de lipídeos e análise do estresse oxidativo, sendo portanto acondicionadas em microtubos e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a utilização. O conteúdo fecal, após coleta também foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a utilização. A figura 1 demonstra de forma esquemática o fluxograma do delineamento experimental descrito acima.



**Figura 1. Fluxograma representativo do delineamento experimental utilizado neste trabalho.**

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

### **4.3. Avaliação do peso corporal, adiposidade e consumo alimentar**

O peso corporal individual e o consumo alimentar por gaiola foram registrados semanalmente. No final do experimento, foram obtidos os pesos relativos do fígado e do tecido adiposo (peso do fígado/peso corporal final x 100). O tecido adiposo subcutâneo foi omitido do cálculo por contribuir minimamente para a adiposidade corporal total. A ingestão alimentar foi avaliada por grupo, considerando-se a soma do que fora oferecido, subtraída pelas sobras na mesma semana. Ao final do experimento, o consumo energético (Kcal) total foi calculado. Considerando a composição de banha e óleo de soja, também foram calculadas as quantidades de ingestão de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

### **4.4. Dosagens plasmáticas**

As dosagens de glicose, proteínas totais, albumina, colesterol total e triglicerídeos, foram realizadas por ensaio enzimático, seguindo as recomendações do fabricante (kit Labtest, Brasil) e os resultados expressos em mg/dL.

### **4.5. Avaliações realizadas no intestino delgado**

#### **4.5.1. Contagem de trofozoítos desprendidos do epitélio intestinal**

Com o propósito de confirmação da infecção, parte do intestino delgado ( $\pm 18$ cm) foi utilizada. Após abertura longitudinal e maceração do tecido, o mesmo foi acondicionado a 4°C em tubos cônicos contendo PBS, durante o período mínimo de 15 minutos, em seguida este conteúdo foi homogeneizado e, finalmente, os trofozoítos desprendidos no líquido sobrenadante foram observados em lâminas, ao microscópio.

#### **4.5.2. Histopatologia e morfometria do duodeno**

Após o período de fixação em solução de formol, os fragmentos de intestino delgado coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina, para obtenção de cortes com 4  $\mu$ m de espessura. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes histológicos foram visualizados pela objetiva de 10X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) para a digitalização aleatória de 30 vilosidades e criptas intestinais por meio da microcâmara JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan). A altura das vilosidades, assim como a profundidade das criptas foram mensuradas manualmente com

ferramentas do software KS400, contido no analisador de imagens Carl Zeiss. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens, processamento digital e definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliarì (1997).

Por intermédio de um patologista foi avaliada a intensidade do infiltrado inflamatório de acordo com o seguinte critério: ausente (quando a mucosa apresentava quantidade e tipos de células na lâmina própria e submucosa compatíveis com a normalidade); discreta (quando havia pequeno aumento do número de células na lâmina própria); moderada (quando havia acréscimo do número de células na lâmina própria, em relação à categoria anterior); intenso (quando havia aumento significativo do número de células na lâmina própria e presença de células inflamatórias na submucosa); acentuada (quando havia maior quantidade de células na lâmina própria e na submucosa, em relação à categoria anterior).

O mesmo observador avaliou a intensidade do parasitismo no lúmen duodenal, bem como pesquisou a presença de trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal. O seguinte critério foi adotado quanto à presença de trofozoítos no lúmen e/ou aderidos ao epitélio duodenal: ausente (quando não havia trofozoítos); discreto (presença de pequena quantidade de trofozoítos); moderado (maior quantidade de trofozoítos em relação à categoria anterior); intenso (maior quantidade de trofozoítos em relação à categoria anterior); acentuado (maior quantidade de trofozoítos em relação à categoria anterior).

#### ***4.5.3. Extração e determinação de citocinas***

Fragmentos do tecido foram macerados em 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,89g diluídos em 1 litro). A solução resultante foi centrifugada por 10min a 10000 RPM a 4°C e o sobrenadante recolhido para a dosagem de IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$ , pelo método de ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção), utilizando kit comercial (R&D Systems, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão.



#### ***4.5.4. Dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS***

Fragmentos de cerca de 100mg do tecido foram macerados em 1 mL de solução salina (PBS), pH 7,2. A solução resultante foi centrifugada por 10min a 10000 RPM a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de todos os parâmetros relativos ao estresse oxidativo. Resumidamente, a determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi feita da seguinte maneira: o homogenato de intestino foi colocado em tubos de vidro, aos quais foram adicionados a solução de TBARS (ácido tricloroacético a 15% + ácido tiobarbitúrico a 0,375% + HCl 0,25N + água deionizada q.s.p.). Em seguida, os tubos permaneceram em banho-maria fervente por 15 minutos, sendo posteriormente resfriados em água corrente. Após o resfriamento foram acrescentados 750µL de álcool butílico com posterior homogeneização e centrifugação a 3000 RPM por 10 minutos. Por fim, 200 µL do sobrenadante foram pipetados em microplaca de 96 poços e, em seguida, a concentração foi lida em leitor de microplaca a 535nm. A dosagem de TBARS foi expressa por: concentração de MDA por grama de proteína no tecido, dosada da mesma forma que a proteína plasmática, conforme descrito previamente.

#### ***4.5.5. Dosagem da atividade da enzima antioxidante catalase***

A dosagem da atividade da enzima catalase foi baseada na técnica descrita por Nelson & Kieson, 1972. Uma vez que a catalase decompõe o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, este método permite a observação direta da decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou atividade da catalase, pela diminuição da absorbância a 240nm. Resumindo, 25µL da porção sobrenadante do homogenato de tecido foram colocados em uma cubeta de quartzo, acrescentando-se o reagente (300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + 10ml de H<sub>2</sub>O miliQ) e ainda, 1mL de solução salina. A leitura foi efetuada entre 0 e 60 segundos a 240nm e os cálculos feitos pela diferença de leitura de tempo final (60s) pelo tempo inicial (0s), dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado foi expresso por unidade de catalase por grama de proteína, dosada da mesma maneira que a proteína plasmática, conforme descrito previamente.

#### ***4.5.6. Dosagem da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase***

Para dosagem da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), 30µL do homogenato de intestino, foram distribuídos em placa de 96 poços e acrescidos de 99µL de tampão fosfato, 6µL de brometo de dimetiliazol – difeniltetrazolium (MTT) e 15µL de

pirogallol, exatamente nesta ordem. Após 5 minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada com 150µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e a absorbância foi lida a 570nm. Para o cálculo do resultado, foi considerado que 1 unidade (U) de SOD foi capaz de oxidar 50% de pirogallol da solução padrão. O resultado foi expresso em Unidade de SOD por grama de proteína.

#### **4.6. Avaliações realizadas no tecido adiposo**

##### **4.6.1. Quantificação das estruturas semelhantes a coroas (Crown-Like Structures – CLS)**

Após o período de fixação, todos os fragmentos coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina. De cada bloco, foram feitos cortes de 7µm de espessura e corados com H&E. Para quantificação das estruturas semelhantes a coroas (Crown-Like Structures – CLS), 10 campos representativos foram visualizados pela objetiva de 40X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) e digitalizados por meio da microcâmera JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan). Foram contados o número de CLS por imagem e calculado o número médio de CLS.

##### **4.6.2. Extração e determinação de adipocinas**

Fragmentos do tecido foram macerados em 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,89g diluídos em 1 litro). A solução resultante foi centrifugada por 10 minutos a 10000 RPM a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , leptina e adiponectina pelo método de ELISA, utilizando kit comercial (R&D Systems, USA), conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão.

#### **4.7. Avaliações realizadas no fígado**

##### **4.7.1. Histopatologia e morfometria da esteatose hepática**

Após o período de fixação em solução de formol, os fragmentos de fígado coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina, para obtenção de cortes com 4 µm de espessura, corados com H&E. Os cortes histológicos foram visualizados pela

objetiva de 40X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) para a digitalização de 30 imagens aleatórias em cada animal, por meio da microcâmara JVC TK-1270/RGB (Tokyo, Japan). A área ocupada pelas vesículas repletas de gordura no interior dos hepatócitos foi calculada usando-se o mesmo analisador de imagens. Foram medidas a área total ocupada por vesículas que possuíam entre 1 e 40  $\mu\text{m}^2$  de área (microvesículas) e a área total ocupada por vesículas com área maior de 40  $\mu\text{m}^2$  (macrovesículas). Em seguida, foram somados os resultados das duas áreas para a obtenção da área total de esteatose. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens, processamento digital e definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliari (1997).

#### ***4.7.2. Extração e quantificação de lipídeos***

A determinação do perfil lipídico hepático foi feita após a extração dos lipídeos totais por solvente orgânico, conforme descrito por Folch et al. (1957), utilizando-se 100mg de tecido hepático. A quantidade de lipídeos totais foi calculada pela diferença do peso dos tubos utilizados para extração antes e após o procedimento. Para determinação das concentrações de colesterol total e triglicerídeos, os extratos lipídicos foram ressuspensos em 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, dos quais 100 $\mu\text{l}$  foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, adicionando-se 200 $\mu\text{l}$  de reagente de cor (Kit Labtest, Brasil). Após incubação de 15 min a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm em leitor de microplaca.

#### ***4.7.3. Avaliação do estresse oxidativo***

Um fragmentos de cerca de 100mg do tecido foi macerado em 1 mL de solução salina, pH 7,2. A solução resultante foi centrifugada por 10 minutos a 10000 RPM a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. As dosagens de TBARS, catalase e superóxido dismutase foram realizadas exatamente como aquelas descritas previamente para o intestino delgado.

### ***4.8. Avaliação realizada no conteúdo fecal***

#### ***4.8.1. Extração e quantificação de lipídeos***

Para determinação do perfil lipídico do conteúdo fecal, foi feita a extração dos lipídeos totais por solvente orgânico, conforme descrito por Folch et al. (1957) utilizando-se, porém, 25mg de fezes. A quantificação de lipídeos totais, de colesterol e de triglicerídeos foram feitas conforme descrito previamente para o tecido hepático.

## **4.9. Avaliações realizadas no baço**

### **4.9.1. Cultura de células**

Inicialmente, foi feita a assepsia do abdômen dos gerbils com álcool 70° com o auxílio de uma gaze estéril e em seguida com álcool iodado a 3%. Após a abertura da cavidade abdominal com material cirúrgico estéril, o baço foi retirado de forma asséptica em fluxo laminar, e colocado em placas de 24 poços contendo meio RPMI 1640 incompleto (Sigma-Aldrich, EUA) acrescido de 0,05g de Hepes (Sigma-Aldrich, EUA), para manutenção da viabilidade das células. Em seguida, com auxílio de pinça estéril, cada baço foi transferido para um macerador estéril, contendo 2 mL do mesmo meio. O macerado resultante foi transferido para um tubo de centrifuga de fundo cônico, para centrifugação a 1500 RPM e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado ao sedimento 2 mL do tampão de lise (0,802g de cloreto de amônio, 0,084g de bicarbonato de sódio e 0,037g de EDTA para 1ml de tampão) seguido de 2 min de repouso, para lisar as hemácias. O volume foi completado para 15 mL com meio RPMI 1640 incompleto e outra vez centrifugado a 1500 RPM e 4°C por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 2 mL de meio RPMI 1640 completo. As células foram então contadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para que em cada poço da placa de 24 poços, fossem colocadas  $5 \times 10^6$  células. Para cada animal foram feitos três poços, contendo o volume de 1mL: o primeiro sem estímulo, o segundo com concavalina A (5 µg por mL) e o último com antígeno de *Giardia*, previamente preparado no nosso laboratório.

### **4.9.2. Determinação de citocinas**

Da cultura de células, estimuladas com antígeno de *Giardia*, foi feita a dosagem das citocinas IL-1, IL-4, IL-13, IL-17 e IFN- $\gamma$ , pelo método de ELISA, utilizando kit comercial (R&D Systems, USA), conforme as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em ng/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão.

### **4.10. Análise estatística**

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão e analisados com o programa Prisma (GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA), versão 6.0. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados, o teste de Grubbs para detecção de *outliers* e, para comparação de médias entre os seis grupos experimentais, foi feita a Análise

de Variâncias (ANOVA), seguida do teste de Newman-Keuls ou teste de Dunn (para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente). Para avaliação entre dois grupos ou em um intervalo de tempo dentro de cada grupo, foi utilizado o Teste t-Student. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

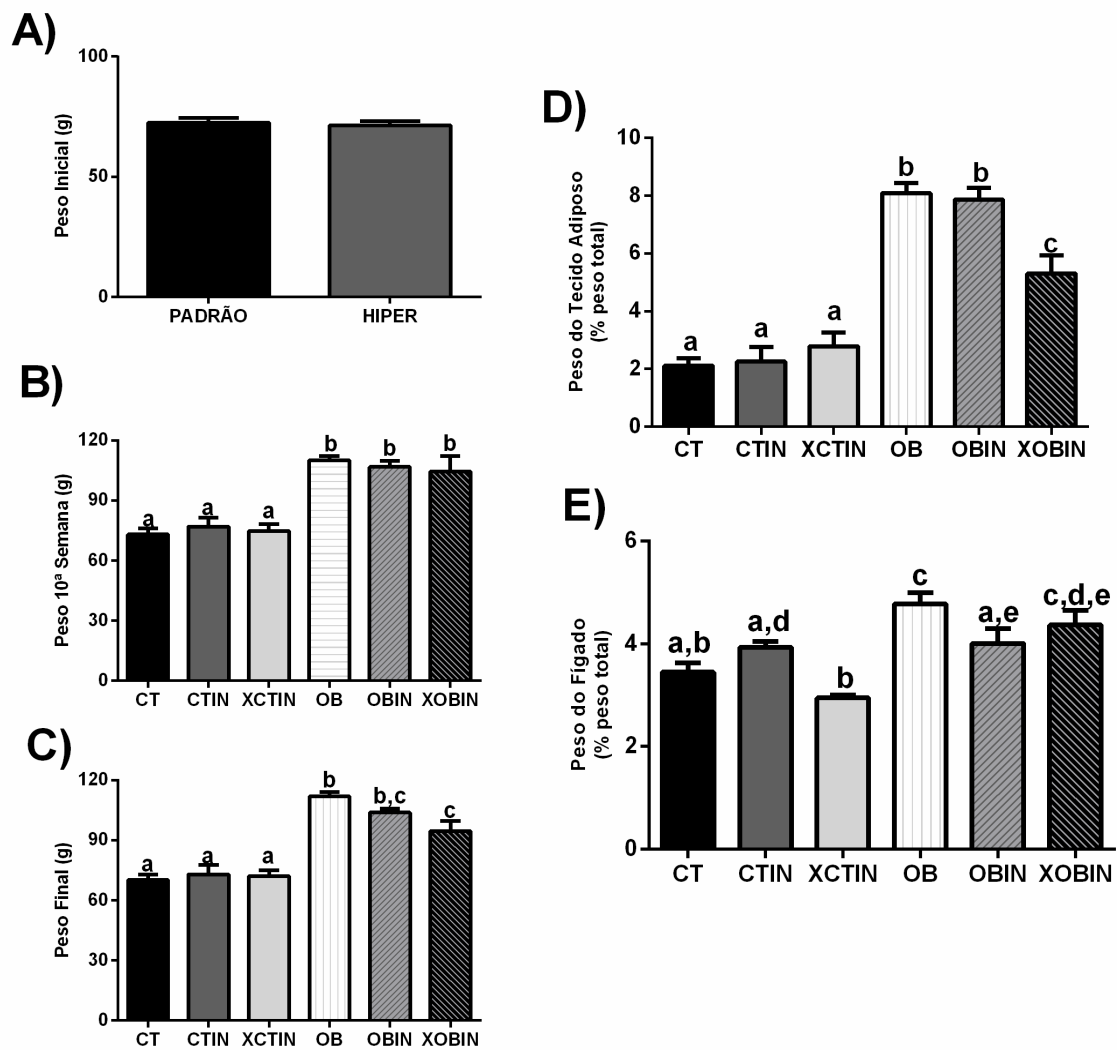
## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Peso corporal, adiposidade e consumo alimentar*

O peso médio dos gerbils no início do experimento (Figura 2A) era igual (Controle =  $72,47 \pm 1,97$ g; Hiper =  $71,34 \pm 1,77$ g)  $p= 0,74$ . Na 10ª semana experimental os gerbils dos dois grupos foram subdivididos em 3 grupos experimentais cada: Controle em CT, CTIN, XCTIN e Hiper em OB, OBIN e XOBIN, com sete animais em cada grupo. Neste momento, constatou-se que o peso médio dos gerbils dos grupos alimentados com dieta para indução de obesidade era significativamente maior do que o peso médio dos animais alimentados com dieta Controle,  $p<0,0001$  (Figura 2B). No final do experimento, após 1 ou 2 semanas de infecção, de acordo com cada grupo, foi observado que os gerbils alimentados com dieta Controle ainda apresentavam peso menor do que aqueles que receberam dieta Hiper,  $p<0,001$ , no entanto, a dieta Hiper associada a maior tempo de infecção (XOBIN) acarretou em diminuição do peso destes animais, quando comparados ao grupo OB ( $p<0,01$ ) (Figura 2C).

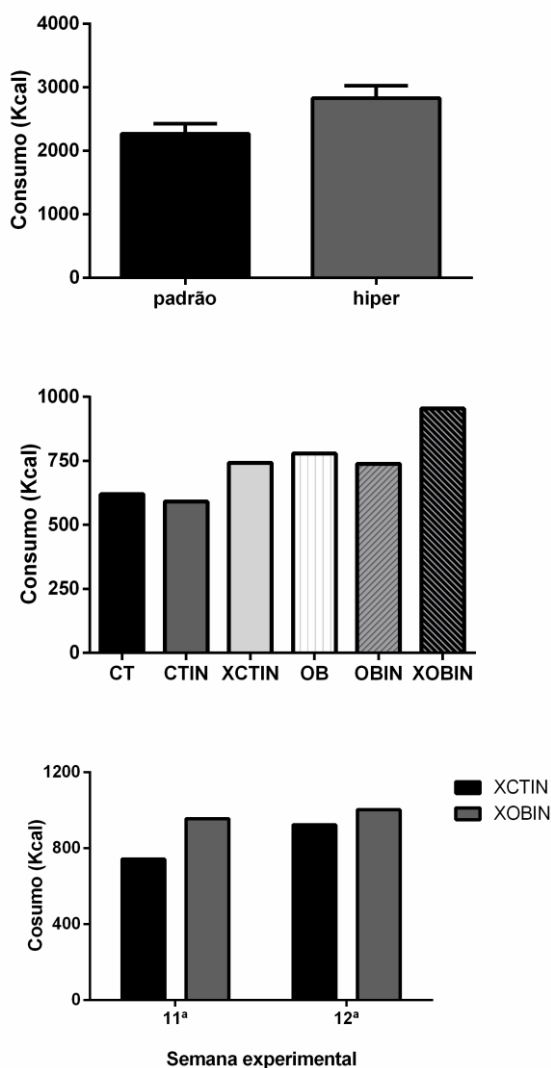
Ao avaliar o peso relativo do tecido adiposo (Figura 2D), verificou-se que os gerbils dos grupos alimentados com dieta Hiper, tiveram maior adiposidade corporal do que a encontrada nos gerbils alimentados com a dieta Controle,  $p<0,0001$ . Após duas semanas de infecção, os animais do grupo XOBIN apresentaram menor peso relativo de tecido adiposo, quando comparados aos animais dos grupos OB ( $p<0,01$ ) e OBIN ( $p<0,01$ ).

O peso relativo do fígado (Figura 2E) foi maior nos gerbils do grupo OB em relação aos animais alimentados com a dieta Controle CT  $p<0,001$ , CTIN  $p<0,05$ , e XCTIN ( $p<0,0001$ ). A infecção por *G. lamblia* por duas semanas (grupo XCTIN) reduziu significativamente o peso relativo do fígado dos animais alimentados com a dieta controle ( $p<0,01$ ). Na infecção associada à obesidade, o peso relativo do fígado diminuiu após a 1ª semana de infecção (grupo OBIN)  $p<0,05$ , e se restabeleceu após a segunda semana (grupo XOBIN), tornando-se semelhante ao encontrado nos animais obesos (grupo OB). Os valores absolutos dos resultados relativos a este ítem podem ser vistos no anexo B.



**Figura 2.** (A) Peso inicial, (B) Peso na 10ª semana, (C) Peso Final, (D) Peso relativo do tecido adiposo e (E) Peso relativo do fígado dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no decorrer do período experimental. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão.  $n=7$ .

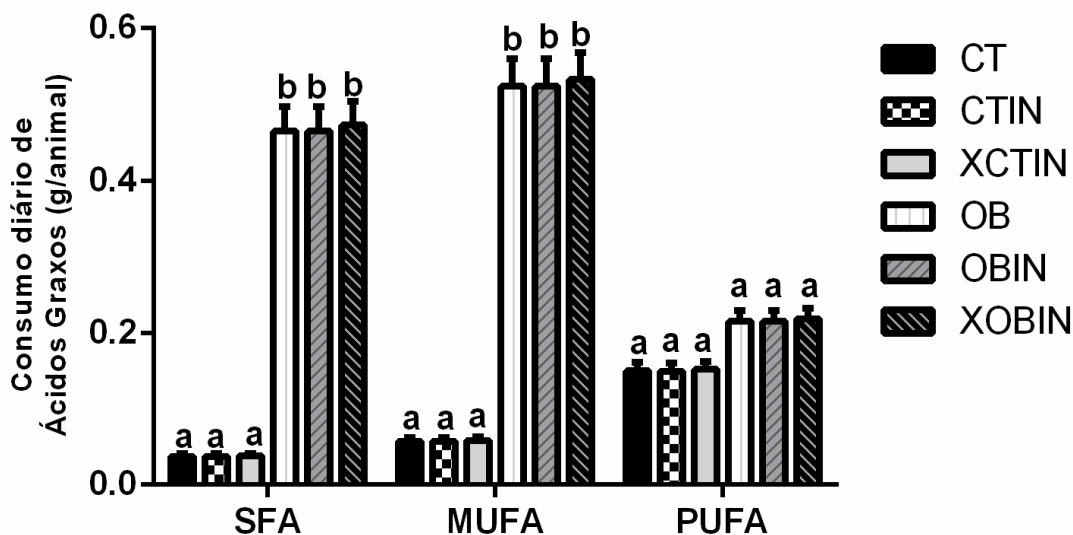
A avaliação do consumo alimentar mostrou que a quantidade calórica consumida, foi semelhante entre todos os grupos experimentais, não sendo alterada pela obesidade (Figura 3A) ou pelo tempo de infecção (Figura 3B e 3C).



**Figura 3. (A) Consumo médio semanal dos grupos Padrão e Controle durante as primeiras 10 semanas de experimento. (B) Consumo médio dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), após 1 semana do inóculo de *Giardia lamblia*. (C) Consumo médio dos gerbils dos grupos Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), após 1 e 2 semanas do inóculo de *Giardia lamblia*. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7.**



No entanto, a ingestão de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Figura 4) foi significativamente maior nos animais alimentados com a dieta Hiper (grupos OB  $p<0,0001$ , OBIN  $p<0,0001$  e XOBIN  $p<0,0001$ ).

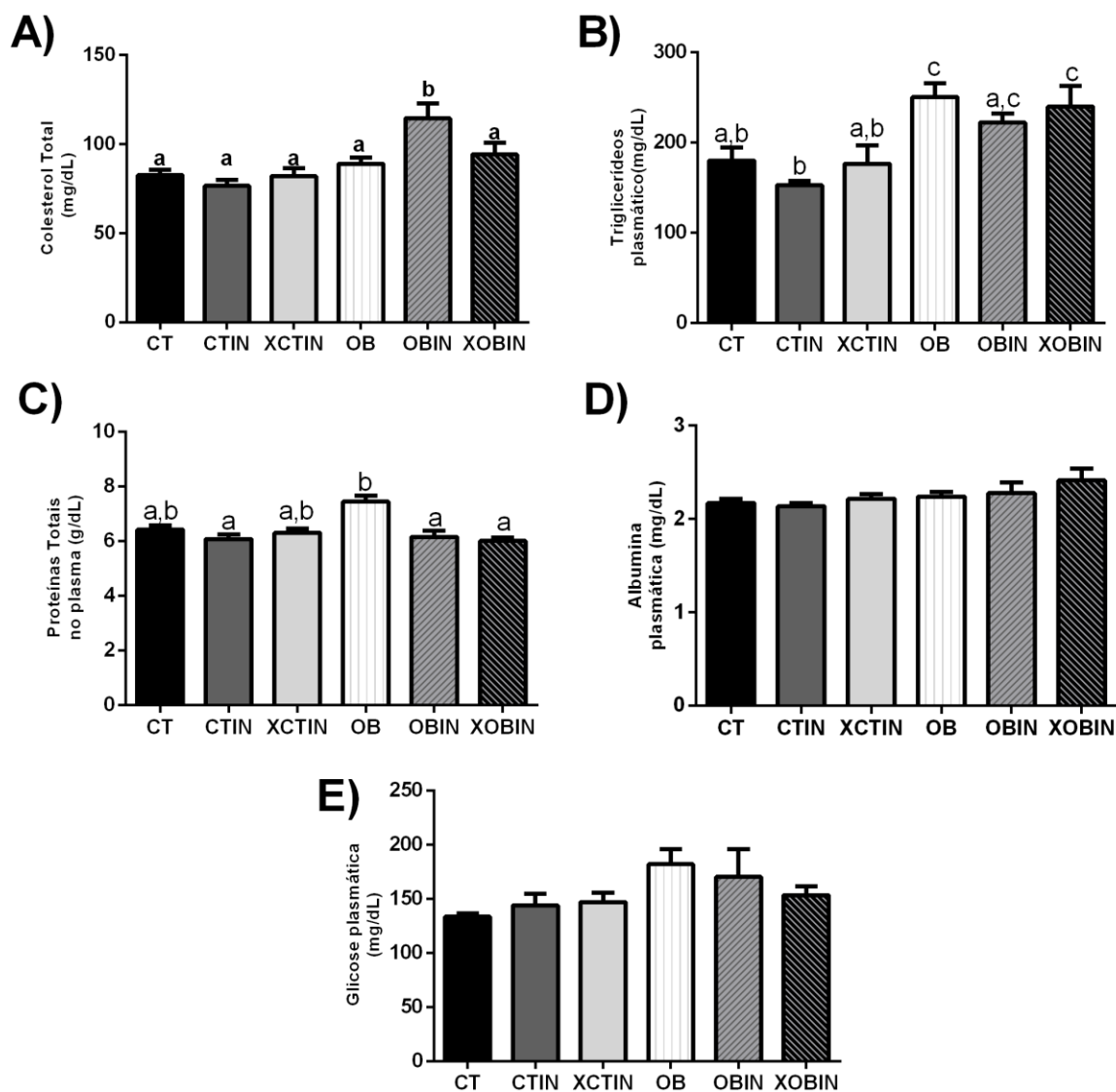


**Figura 4.** Consumo médio de ácidos graxos dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), durante o experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão.  $n=7$ . SFA = ácido graxo saturado, MUFA = ácido graxo monoinsaturado, PUFA = ácido graxo poliinsaturado. . Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão.  $n=7$ .

## 5.2. Dosagens plasmáticas

A figura 5 apresenta os resultados das dosagens bioquímicas. A infecção com *G. lamblia* durante uma semana levou ao aumento de colesterol circulante em animais obesos (Grupo OBIN), quando comparados aos demais grupos (Figura 5A). Esta alteração foi normalizada após duas semanas de infecção (Grupo XOBIN). A obesidade acarretou no aumento da concentração de triglicerídeos (TGL) nos gerbils (Figura 5B), porém a infecção por *G. lamblia* também influenciou na concentração de TGL, diminuindo-a no Grupo CTIN) ao compará-lo com OBIN  $p<0,05$ . Aumento de proteínas totais circulantes foi verificado apenas nos animais obesos sem infecção (Figura 5C). Por outro lado, os níveis plasmáticos de

albumina glicose (Figura 5D) e de glicose (Figura 5E) não foram modificados com a obesidade e nem com a infecção. Os valores absolutos dos resultados encontrados estão descritos no anexo C.



**Figura 5. Resultados das dosagens de (A) Colesterol Total, (B) Triglicerídeos, (C) Proteínas totais, (D) Albumina e (E) Glicose nos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7.**

### **5.3. Resultados das avaliações realizadas nos tecidos: intestino delgado, tecido adiposo, fígado e baço**

#### **5.3.1. Verificação de trofozoítos desprendidos do epitélio intestinal**

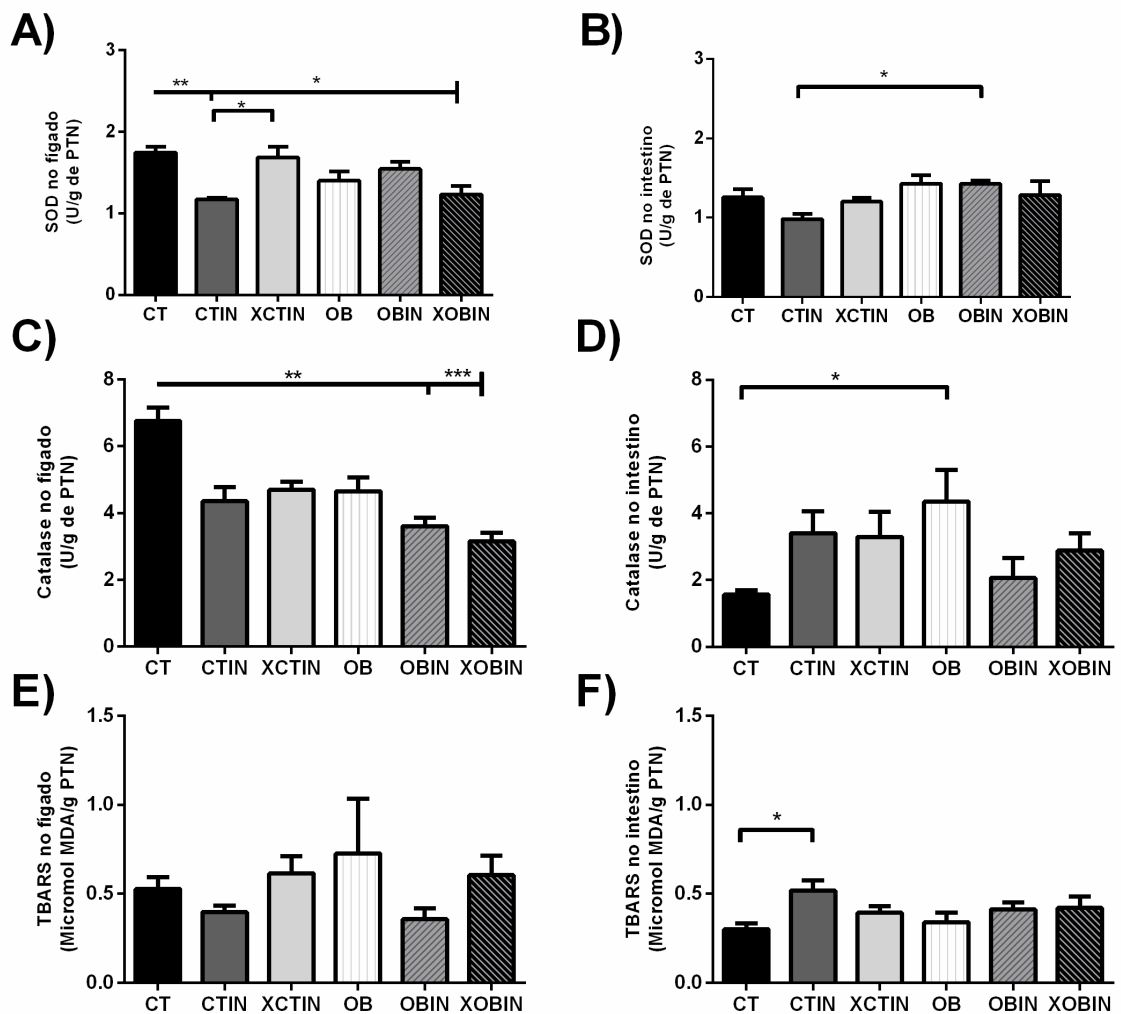
Todos os gerbils dos grupos infectados CTIN, XCTIN, OBIN e XOBIN apresentaram-se positivos para a infecção pelo parasito *Giardia lamblia*.

#### **5.3.2. Avaliação do estresse oxidativo no fígado e no intestino delgado**

A figura 6 apresenta os resultados de parâmetros de estresse oxidativo avaliados no intestino delgado e no fígado dos gerbils. Quando comparados ao grupo controle saudável (CT), verificou-se que a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) reduziu no fígado de gerbils alimentados com dieta controle após uma semana de infecção (CTIN), mas foi restabelecida nos gerbils infectados por duas semanas (XCTIN). Também houve menor atividade enzimática no fígado de gerbils alimentados com dieta hiper infectados por duas semanas (XOBIN) (Figura 6A). No intestino delgado uma semana de infecção por *G. lamblia* reduziu a atividade da SOD nos gerbils do grupo controle (CTIN), quanto comparados a obesos infectados por uma semana (OBIN) (Figura 6B).

A atividade da enzima catalase no fígado (Figura 6C) foi reduzida apenas quando a obesidade foi associada com infecção por uma (OBIN) ou duas semanas (XOBIN), enquanto que no intestino delgado, foi aumentada nos gerbils do grupo OB, quando comparados aos gerbils do grupo CT (Figura 6D).

Na dosagem de TBARS no fígado não houve diferença alguma entre os grupos (Figura 6E). No intestino delgado, a infecção com *G. lamblia* por uma semana aumentou a produção intestinal de TBARS nos gerbils alimentados com dieta Controle (CTIN), quando comparados aos gerbils do grupo CT. Os valores absolutos dos resultados encontrados estão descritos no anexo D.



**Figura 6. Resultados das dosagens de (A) Superóxido dismutase (C) Catalase e (E) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e (B) Superóxido dismutase (D) Catalase e (F) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 6-7.**

### 5.3.3. Extração e quantificação de lipídeos no fígado e no conteúdo fecal

Os dados relativos aos resultados da extração e quantificação de lipídeos no fígado e no conteúdo fecal estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2. Resultados da extração e quantificação de lipídeos no fígado e no conteúdo fecal dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 6-7.**

#### PARÂMETROS

<b>GRUPOS</b>	<b>Lipídeos Totais no fígado (g/mg tecido)</b>	<b>Triglicerídeos no fígado (g/mg tecido)</b>	<b>Colesterol no fígado (g/mg tecido)</b>	<b>Lipídeos Totais nas fezes (g/mg fezes)</b>	<b>Triglicerídeos nas fezes (g/mg fezes)</b>	<b>Colesterol nas fezes (g/mg fezes)</b>
<b>CT (n=7)</b>	52,93 $\pm$ 3,66 <sup>a</sup>	3,28 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	4,78 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	2,83 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,08	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>a,b,c</sup>
<b>CTIN (n=7)</b>	75,29 $\pm$ 5,33 <sup>a</sup>	27,90 $\pm$ 3,43 <sup>a,b</sup>	2,97 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	7,00 $\pm$ 1,25 <sup>a,b</sup>	0,20 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,04 <sup>a,b</sup>
<b>XCTIN(n=7)</b>	48,14 $\pm$ 6,22 <sup>a</sup>	4,07 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	4,77 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	6,42 $\pm$ 0,92 <sup>a,b</sup>	0,34 $\pm$ 0,11	0,48 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<b>OB (n=6-7)</b>	210,0 $\pm$ 16,45 <sup>b</sup>	93,89 $\pm$ 5,90 <sup>b</sup>	7,75 $\pm$ 0,56 <sup>c</sup>	8,71 $\pm$ 1,97 <sup>a,b</sup>	0,50 $\pm$ 0,13	0,01 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>
<b>OBIN (n=7)</b>	203,7 $\pm$ 25,82 <sup>b</sup>	79,71 $\pm$ 7,98 <sup>b</sup>	8,74 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>	14,14 $\pm$ 1,45 <sup>b,c</sup>	0,38 $\pm$ 0,09	0,25 $\pm$ 0,04 <sup>a,b</sup>
<b>XOBIN(n=7)</b>	239,8 $\pm$ 29,91 <sup>b</sup>	107,2 $\pm$ 7,46 <sup>b</sup>	9,30 $\pm$ 0,58 <sup>c</sup>	11,43 $\pm$ 1,86 <sup>b,c</sup>	0,45 $\pm$ 0,10	0,10 $\pm$ 0,03 <sup>a,c</sup>

Todos os grupos de gerbils que receberam dieta hiperlipídica apresentaram teores de lipídeos totais significativamente maior do que os grupos de gerbils que receberam dieta padrão ( $p < 0,0001$ ). Além disso, a quantidade de triglicerídeos no fígado do grupo CT foi menor que OB ( $p < 0,01$ ), OBIN ( $p < 0,05$ ) e XOBIN ( $p < 0,001$ ), como também foi menor no grupo XCTIN comparado a OB ( $p < 0,01$ ), OBIN ( $p < 0,05$ ) e XOBIN ( $p < 0,01$ ). CTIN não foi diferente de nenhum grupo. O colesterol hepático foi significativamente maior nos gerbils obesos, quando comparados aos controles ( $p < 0,0001$ ), porém entre os gerbils controle, houve menor concentração no grupo CTIN quando comparado a CT ( $p < 0,05$ ) e XCTIN ( $p < 0,05$ ).

A infecção com *G. lamblia* por uma ou duas semanas aumentou a excreção fecal de lipídeos nos animais obesos (OBIN e XOBIN), comparando-se aos animais do grupo CT ( $p < 0,05$ ). Não houve alteração na excreção fecal de triglicerídeos, mas verificou-se que a

excreção de colesterol foi diferente entre OB e CTIN ( $p<0,05$ ), OB e XCTIN ( $p<0,001$ ) e OB e OBIN ( $p<0,05$ ), assim como entre XCTIN e XOBIN ( $p<0,05$ ).

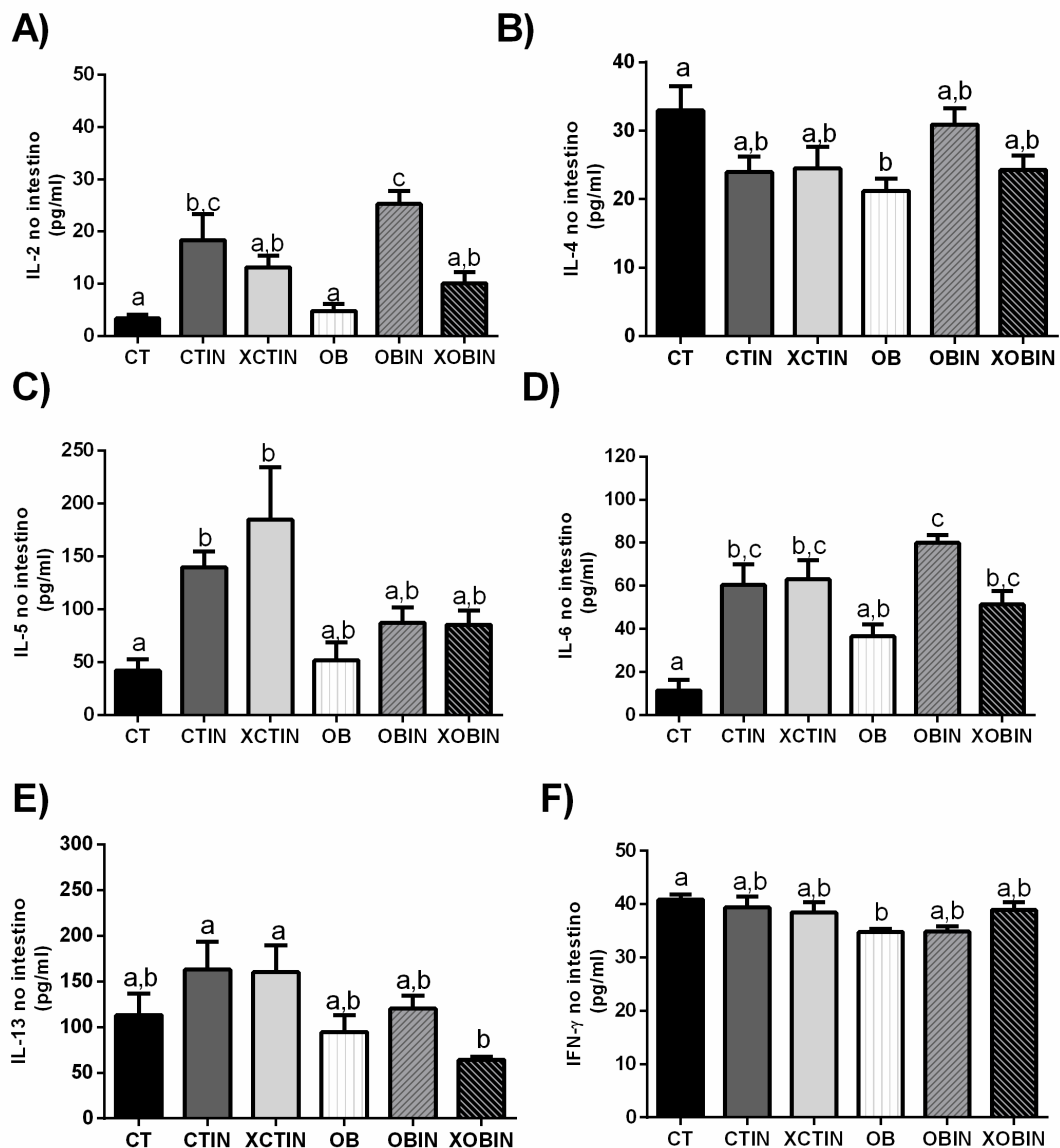
#### 5.3.4. Dosagens de Citocinas no intestino delgado, tecido adiposo e baço

No intestino delgado, não houve diferença nos níveis das citocinas IL-1, IL-10, IL-17 e TNF- $\alpha$  (Tabela 3). A obesidade não alterou, mas a infecção por uma semana aumentou os níveis da citocina IL-2 no intestino de gerbils alimentados com dieta Controle (CTIN),  $p<0,01$ , quando comparados aos grupos CT e OB ou Hiper (OBIN)  $p<0,01$  (Figura 7A), quando comparados aos grupos CT, XCTIN, OB e XOBIN. Por outro lado, gerbils obesos (OB) tiveram redução nos teores de IL-4, em relação ao grupo CT ( $p<0,05$ ) (Figura 7B). A infecção por uma (CTIN) ou duas semanas (XCTIN), aumentou os níveis de IL-5 ( $p<0,05$ ) nos gerbils dos grupos alimentados com dieta controle, quando comparadas ao grupo CT sem infecção (Figura 7C). A infecção aumentou ainda, os níveis de IL-6 em todos os gerbils infectados por uma (CTIN e OBIN),  $p<0,001$  ou duas semanas (XCTIN e XOBIN)  $P<0,01$ , quando comparados com o grupo CT. O grupo obeso (OB) apresentou nível mais baixo dessa citocina do que OBIN,  $p<0,01$  (Figura 7D). Quanto à citocina IL-13 (Figura 7E), a infecção por duas semanas em gerbils obesos (XOBIN) causou redução nos teores desta citocina em relação aos encontrados nos grupos CTIN e XCTIN ( $p<0,05$ ). Gerbils obesos não infectados (grupo OB) tiveram redução dos níveis de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo CT ( $p<0,05$ ) (Figura 7E). Os valores absolutos dos resultados encontrados estão descritos no anexo E.

**Tabela 3. Resultados das dosagens das citocinas IL-1, IL-10, IL-17 e TNF- $\alpha$  no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 6-7. Dados expressos em Média  $\pm$  Erro Padrão.**

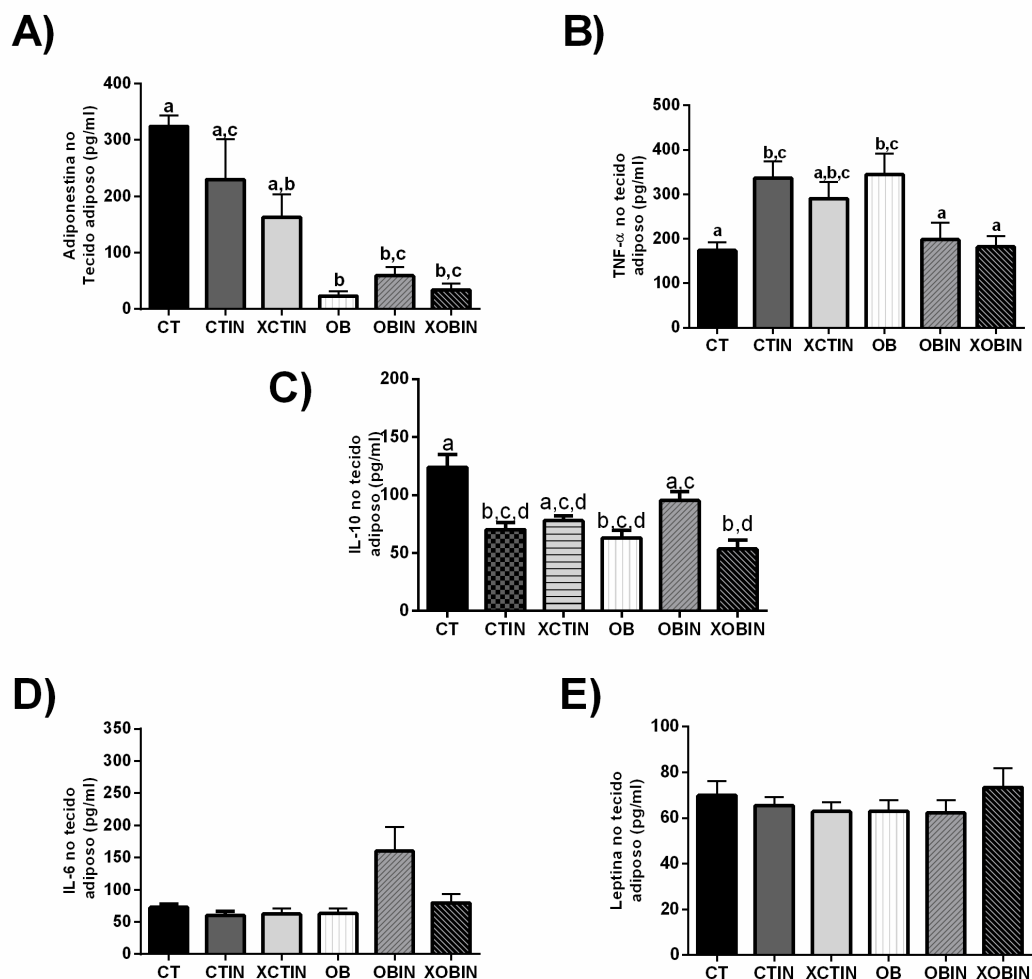
#### CITOCINAS

	IL-1 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
<b>CT (n=7)</b>	62,79 $\pm$ 7,79	7,487 $\pm$ 3,10	23,65 $\pm$ 4,41	236,6 $\pm$ 29,79
<b>CTIN (n=7)</b>	78,13 $\pm$ 9,52	2,666 $\pm$ 1,10	27,7 $\pm$ 2,43	236,3 $\pm$ 30,72
<b>XCTIN(n=7)</b>	85 $\pm$ 9,48	5,339 $\pm$ 2,97	26,43 $\pm$ 4,32	251,8 $\pm$ 25,15
<b>OB (n=6-7)</b>	52,02 $\pm$ 5,08	20,69 $\pm$ 8,26	19,49 $\pm$ 3,34	216,5 $\pm$ 14,14
<b>OBIN (n=7)</b>	65,94 $\pm$ 5,78	5,019 $\pm$ 3,44	27,55 $\pm$ 3,49	245,3 $\pm$ 23,45
<b>XOBIN(n=7)</b>	70,64 $\pm$ 10,62	4,087 $\pm$ 2,40	25,19 $\pm$ 1,87	263,2 $\pm$ 28,59



**Figura 7. (A) Resultado da dosagem da citocina IL-2, (B) IL-4, (C) IL-5, (D) IL-6, (E) IL-13 e (F) IFN- $\gamma$  no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 5-7.**

Na figura 8 estão os resultados das dosagens de hormônios e citocinas no tecido adiposo.



**Figura 8. Resultados das dosagens de (A) Adiponectina, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-10, (D) IL-6 e (E) Leptina no tecido adiposo epididimal dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 5-7.**

Os gerbils alimentados com dieta hiper, apresentaram níveis de adiponectina e IL-10 menores do que o grupo CT. A infecção por *G.lambli*a por si só, também provocou este mesmo perfil nos animais alimentados com dieta controle (Figura 8A, 8C). Já os níveis de TNF- $\alpha$  estiveram aumentados no grupo obeso sem infecção e no grupo controle com uma semana de infecção (CTIN) (Figura 8B). Os níveis de IL-6 (Figura 8D) e leptina (Figura 8E) no tecido adiposo, foram semelhantes em todos os grupos experimentais.



Na tabela 4 é possível observar os resultados referentes à dosagem de citocinas nas culturas de células do baço.

**Tabela 4. Resultados das dosagens das citocinas IL-1, IL-4, IL-13, IL-17 e IFN- $\gamma$  na cultura de células do baço dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 6-7.**

<i>CITOCINAS</i>					
	IL-1 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
<i>CT (n=7)</i>	15,47 $\pm$ 1,78	17,83 $\pm$ 1,08	47,44 $\pm$ 2,50 <sup>a</sup>	11,53 $\pm$ 0,88	43 $\pm$ 2,39
<i>CTIN (n=7)</i>	16,49 $\pm$ 3,10	23,1 $\pm$ 2,69	188,1 $\pm$ 46,51 <sup>a,b</sup>	11 $\pm$ 0,59	43,59 $\pm$ 3,39
<i>XCTIN(n=7)</i>	32,66 $\pm$ 9,22	19,33 $\pm$ 2,16	253 $\pm$ 83,35 <sup>b</sup>	10,3 $\pm$ 0,44	40,82 $\pm$ 3,25
<i>OB (n=7)</i>	61,51 $\pm$ 18,2	18,39 $\pm$ 1,93	131,1 $\pm$ 47,06 <sup>a,b</sup>	10,31 $\pm$ 0,93	37,39 $\pm$ 1,78
<i>OBIN (n=7)</i>	84,88 $\pm$ 31,52	18,66 $\pm$ 1,25	164,3 $\pm$ 36,71 <sup>a,b</sup>	10,47 $\pm$ 0,24	40,56 $\pm$ 2,29
<i>XOBIN(n=7)</i>	22,18 $\pm$ 2,20	20,23 $\pm$ 4,09	68,88 $\pm$ 14,02 <sup>a,b</sup>	12,43 $\pm$ 1,15	50,26 $\pm$ 5,28

Os níveis de IL-1, IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$  na cultura de células do baço foram semelhantes em todos os grupos experimentais. Já IL-13, apresentou níveis mais altos no grupo XCTIN ( $p < 0,05$ ) do que o grupo CT. Os demais grupos não demonstraram diferenças.

### **5.3.5. *Histopatologia e morfometria do duodeno***

A tabela 5 apresenta os resultados da intensidade de parasitismo no duodeno e o infiltrado inflamatório na lâmina própria dos grupos experimentais. O duodeno dos gerbils dos grupos CT e OB apresentou aspecto histológico compatível com a normalidade. No grupo CTIN foram observados parasitismo (de moderado a intenso) e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (de intenso a acentuado) em 100% dos gerbils. O infiltrado era constituído principalmente por linfócitos, seguido de macrófagos e, com pequeno aumento de eosinófilos. A área da lâmina própria e, às vezes, da submucosa, encontrava-se aumentada devido ao aumento do número de células e devido a um maior distanciamento entre elas, característica do edema da lâmina própria e da submucosa.

Já com duas semanas de infecção (grupo XCTIN), 42% dos gerbils apresentou parasitismo de moderado a intenso enquanto em 58% o parasitismo foi discreto. Quanto à intensidade do infiltrado inflamatório, também houve redução quando comparado com a 1ª semana da infecção. O infiltrado inflamatório de moderado a intenso foi observado em 28,6% dos gerbils enquanto o infiltrado discreto foi encontrado em 71,4% do grupo.

No grupo OBIN, 57,1% dos gerbils apresentaram parasitismo discreto em contraposição a 42,9%, que apresentaram parasitismo de moderado a intenso. Quanto ao infiltrado inflamatório, em 42,9% do grupo foi discreto a moderado, enquanto 57,1% foi intenso a acentuado. Contudo, no grupo XOBIN foi observado um aumento da intensidade do parasitismo. Em 71,4% dos gerbils o parasitismo foi de moderado a intenso enquanto em 28,6% dos gerbils o parasitismo foi discreto. O agravamento do parasitismo foi acompanhado pelo aumento da intensidade da inflamação. Em 85,7% dos gerbils, o infiltrado inflamatório foi de intenso a acentuado enquanto em 14,3% foi discreto a moderado.

**Tabela 5. Intensidade de parasitismo no duodeno e Infiltrado inflamatório na lâmina própria dos grupos Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN).**

GRUPOS	INTENSIDADE DA INFLAMAÇÃO					INTENSIDADE DE PARASITISMO				
	(Nº DE ANIMAIS DO GRUPO PERTENCENTES À CATEGORIA)					(Nº DE ANIMAIS DO GRUPO PERTENCENTES À CATEGORIA)				
	Ausente	Discreta	Moderada	Grave	Acentuada	Ausente	Discreta	Moderada	Grave	Acentuada
	0	+	++	+++	++++	0	+	++	+++	++++
CT	7	0	0	0	0	7	0	0	0	0
CTIN	0	0	1	2	4	0	0	0	7	0
XCTIN	0	2	3	2	0	0	4	2	1	0
OB	7	0	0	0	0	7	0	0	0	0
OBIN	0	0	3	2	2	0	4	2	1	0
XOBIN	0	1	0	4	2	0	2	1	4	0

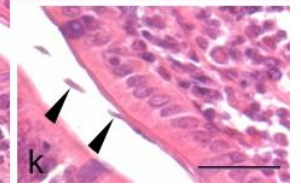
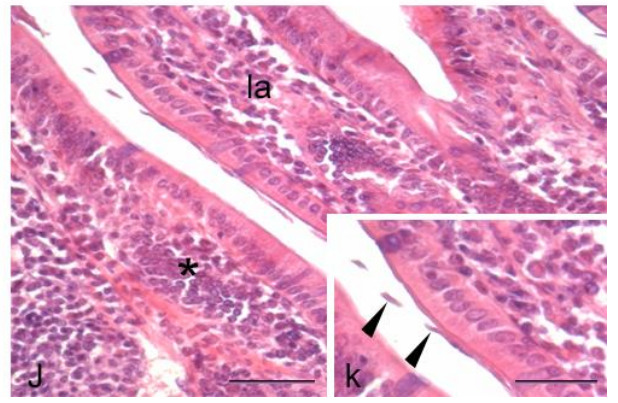
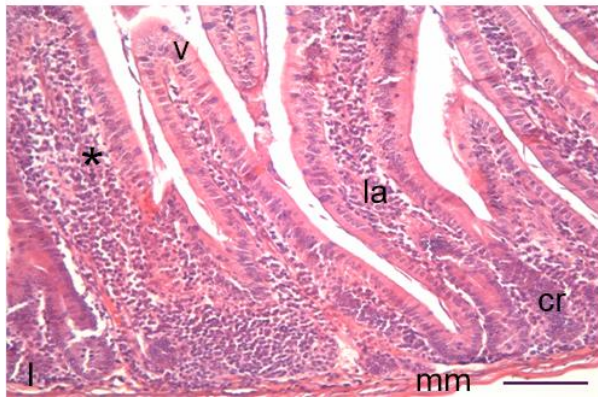
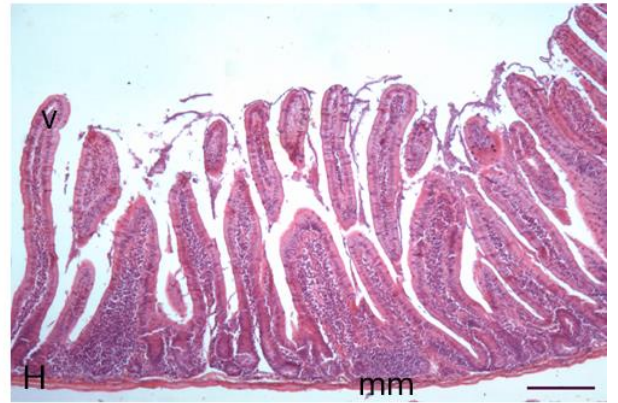
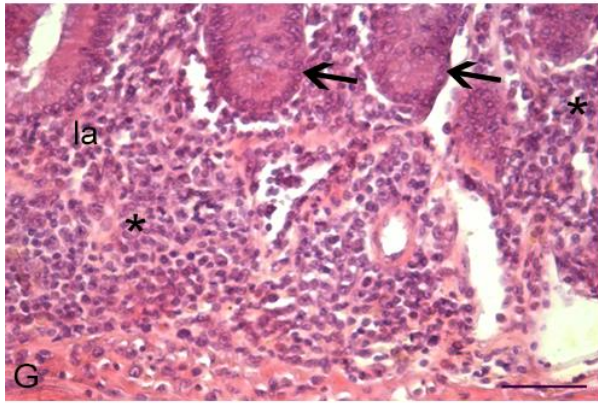
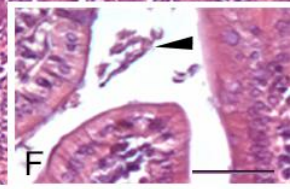
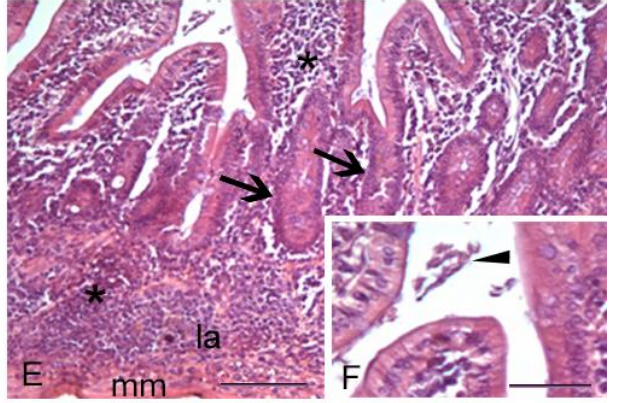
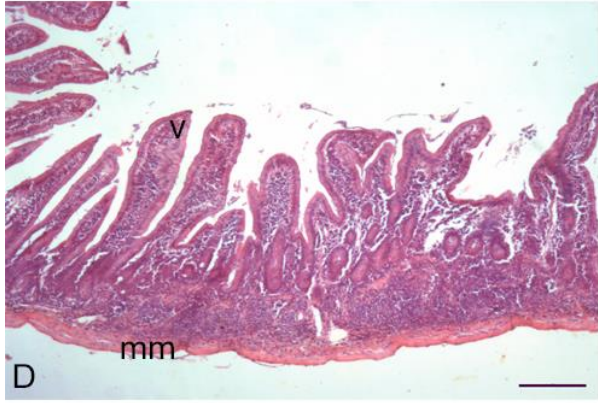
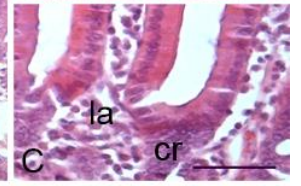
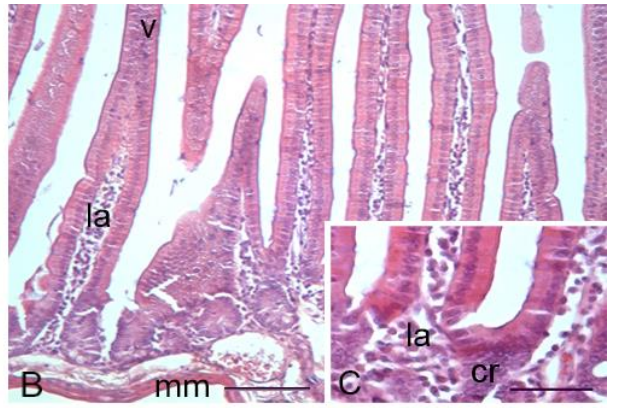
Qualitativamente, com relação à altura das vilosidades intestinais, nos gerbils do grupo XOBIN, foi observada a presença de muitas vilosidades encurtadas quando comparado com o grupo CT (Figura 9A, 9B, 9C e Figura 10G, 10H, 10I e 10J). As criptas intestinais dos gerbils dos grupos CTIN, XCTIN, OBIN e, especialmente do grupo XOBIN, mostraram-se hiperplásicas, com visível aumento de sua profundidade, do número de figuras de mitose e de células caliciformes (Figura 9 e Figura 10).

A tabela 6 apresenta os resultados da análise morfométrica da altura das vilosidades, profundidade das criptas intestinais, assim como a razão vilosidade:cripta dos gerbils dos diferentes grupos experimentais. A altura das vilosidades diminuiu no grupo XOBIN quando comparado a CT ( $p < 0,05$ ), OB ( $p < 0,01$ ) e a OBIN ( $p < 0,001$ ). Os grupos CTIN e XCTIN, também apresentaram vilosidades menores quando comparados a OB ( $p < 0,05$ ) e OBIN ( $p < 0,01$ ). Já a profundidade das criptas, aumentou nos gerbils infectados CTIN ( $p < 0,01$ ), XCTIN ( $p < 0,01$ ), OBIN ( $p < 0,0001$ ) e XOBIN ( $p < 0,0001$ ) quando comparados a CT e OB. Entre os grupos infectados, OBIN, assim como XOBIN, ainda foram maiores do que CTIN ( $p < 0,0001$ ) e XCTIN ( $p < 0,0001$ ). O grupo XOBIN ainda foi maior que OBIN ( $p < 0,01$ ). Como consequência nas alterações de vilosidades e criptas, a razão vilosidade:cripta também foi menor nos gerbils infectados CTIN ( $p < 0,001$ ), XCTIN ( $p < 0,001$ ), OBIN ( $p < 0,001$ ) e

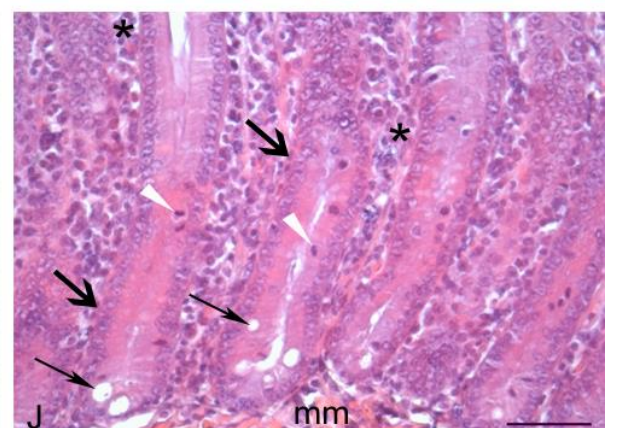
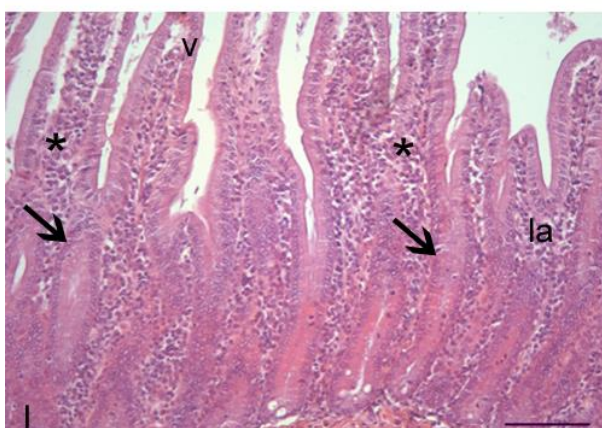
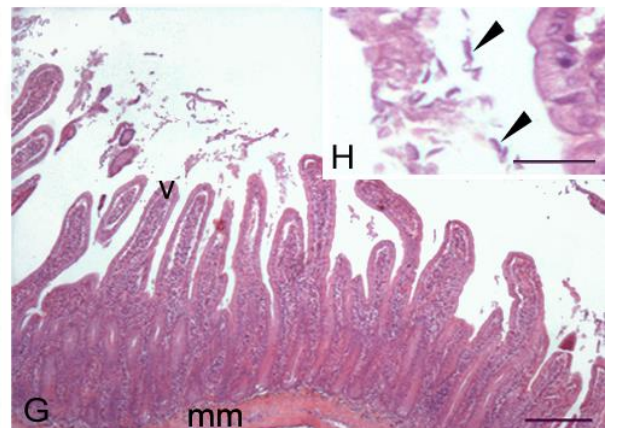
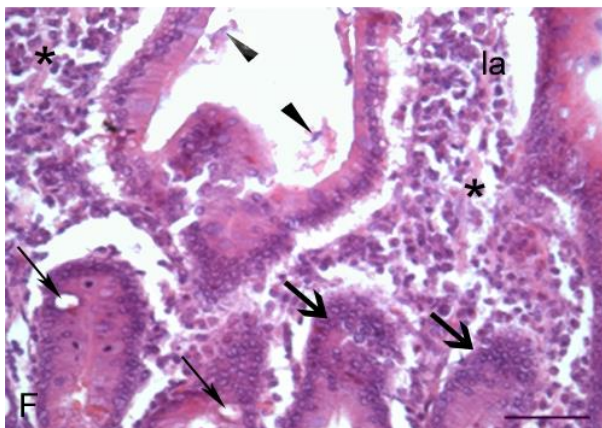
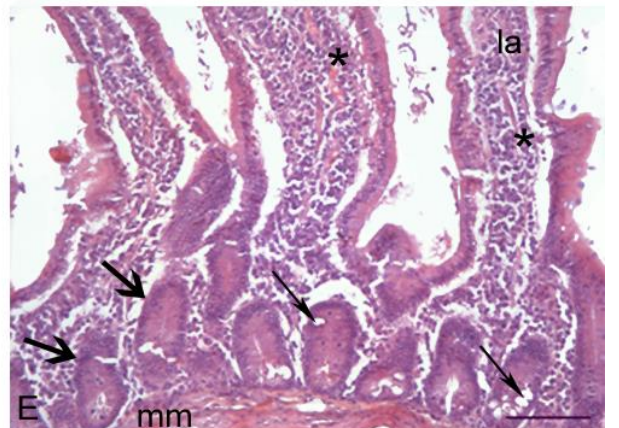
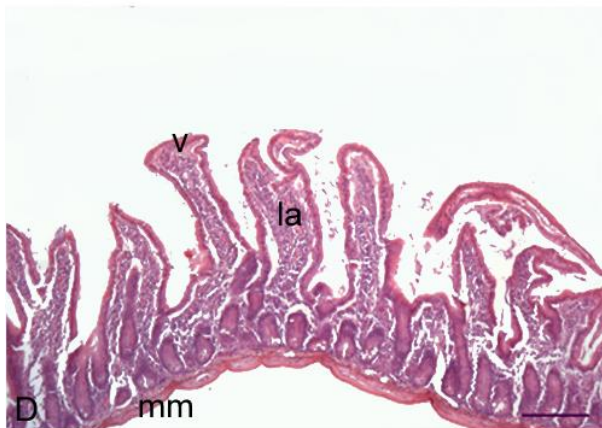
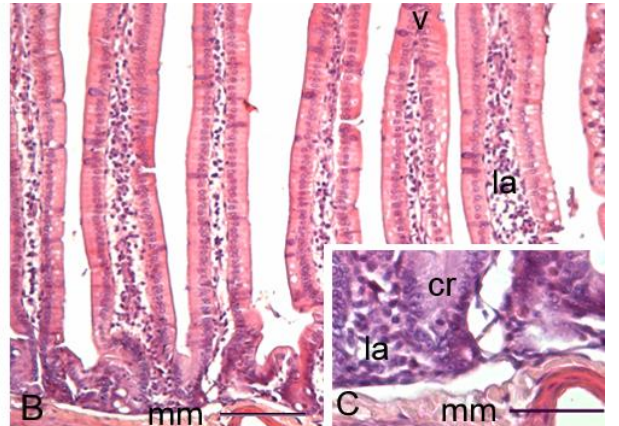
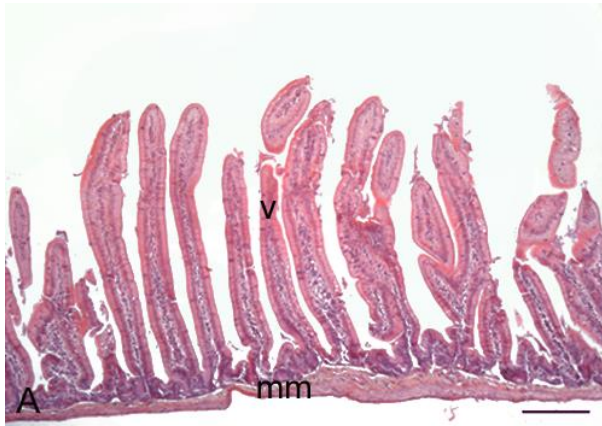
XOBIN ( $p < 0,0001$ ), reduzindo 33,1 %, 35,72%, 37,54% e 57,4% em relação ao controle. Entre os grupos infectados, XOBIN ainda foi menor que CTIN ( $p < 0,001$ ), XCTIN ( $p < 0,01$ ) e OBIN ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 6. Análise morfométrica das vilosidades e criptas duodenais de gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7.**

<i>GRUPOS</i>	<i>PARÂMETROS</i>			
	Altura das Vilosidades ( $\mu\text{m}$ )	Profundidade das Criptas ( $\mu\text{m}$ )	Razão Vilosidade: Cripta	Redução da razão Vilosidade: Cripta em relação ao grupo Controle (%)
<i>CT (n=7)</i>	525,4 $\pm$ 9,51 <sup>a,d</sup>	63,92 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	8,26 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	0
<i>CTIN (n=7)</i>	470,9 $\pm$ 21,31 <sup>a,b</sup>	85,41 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>	5,53 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	33,1
<i>XCTIN (n=7)</i>	467,2 $\pm$ 19,72 <sup>a,b</sup>	88,31 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>	5,31 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	35,72
<i>OB (n=7)</i>	554,8 $\pm$ 29,24 <sup>c,d</sup>	71,42 $\pm$ 3,68 <sup>a</sup>	7,88 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	4,61
<i>OBIN (n=7)</i>	575,8 $\pm$ 18,73 <sup>c,d</sup>	111,6 $\pm$ 2,64 <sup>c</sup>	5,16 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	37,54
<i>XOBIN (n=7)</i>	435,5 $\pm$ 12,73 <sup>b</sup>	127,1 $\pm$ 7,21 <sup>d</sup>	3,52 $\pm$ 0,32 <sup>c</sup>	57,4



**Figura 9. Duodeno de gerbils dos grupos controle sem infecção (CT), controle infectado por 1 semana (CTIN) e controle infectado por 2 semanas (XCTIN).** (A) Grupo CT. Duodeno de aspecto histológico normal. Barra 200  $\mu\text{m}$ . (B) Maior aumento da figura anterior. Barra 100  $\mu\text{m}$ . (C) Detalhe da figura B mostrando a lâmina própria e cripta intestinal com suas celularidades normais. Barra 50  $\mu\text{m}$ . (D) Grupo CTIN: encurtamento de vilosidades intestinais. Barra 200  $\mu\text{m}$ . (E) Aumento da área de lâmina própria às custas de intenso infiltrado inflamatório (\*) e edema. Criptas intestinais hiperplásicas (setas). Barra 100  $\mu\text{m}$ . (F) Detalhe da figura anterior mostrando trofozoítos de *Giardia lamblia* no lúmen intestinal (cabeça de seta). Barra 50  $\mu\text{m}$ . (G) Maior aumento da figura anterior mostrando o infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e parte das criptas hiperplásicas. Barra 50  $\mu\text{m}$ . (H) Grupo XCTIN. Presença de algumas vilosidades intestinais encurtadas. Barra 200  $\mu\text{m}$ . (I) redução do infiltrado inflamatório na lâmina própria em relação ao grupo CTIN. Cripta hiperplásica (cr). Barra 100  $\mu\text{m}$ . (J) Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (\*). (K) Detalhe da figura anterior mostrando menor quantidade de trofozoítos (cabeças de seta) no lúmen intestinal em relação ao grupo CTIN. Barra 50  $\mu\text{m}$ . Vilosidade intestinal (V); *muscularis mucosae* (mm); la (lâmina própria); cr (cripta intestinal). Hematoxilina e Eosina.

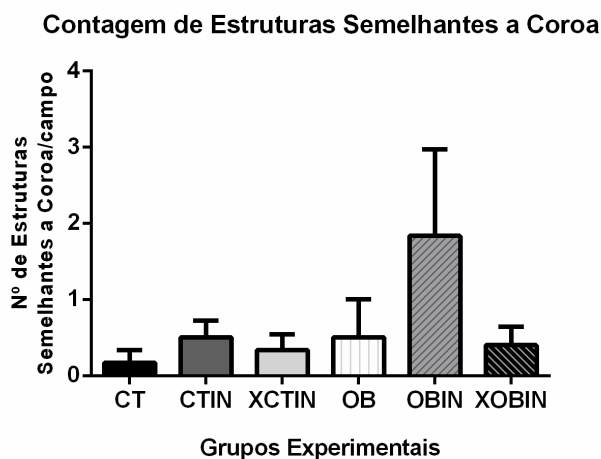


**Figura 10. Duodeno de gerbils dos grupos obeso sem infecção (OB), obeso infectado por 1 semana (OBIN) e obeso infectado por 2 semanas (XOBIN).** (A) Grupo OB. Duodeno de aspecto histológico normal. Barra 200 µm. (B) Maior aumento da figura anterior. Barra 100 µm. (C) Detalhe da figura B mostrando a lâmina própria e cripta intestinal com suas celularidades normais. Barra 50 µm. (D) Grupo OBIN. Notar o encurtamento de vilosidades intestinais. Barra 200 µm. (E) Infiltrado inflamatório (\*) e edema da lâmina própria. Criptas intestinais hiperplásicas (setas largas). Hiperplasia de células caliciformes (setas finas). Barra 100 µm. (F) Maior aumento da figura anterior mostrando o infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (\*), a hiperplasia das criptas (setas largas) e das células caliciformes (setas finas). Escassos trofozoítos de *Giardia lamblia* no lúmen intestinal (cabeças de seta). Barra 50 µm. (G) Grupo XOBIN. Maior quantidade de vilosidades intestinais encurtadas do que o observado no grupo OBIN. Barra 200 µm. (H) Detalhe da figura anterior mostrando grande número de trofozoítos de *Giardia lamblia* no lúmen intestinal (cabeças de seta). Barra 50 µm. (I) Maior aumento da figura anterior mostrando vilosidades encurtadas, criptas bastante hiperplásicas (setas largas) e o infiltrado inflamatório mais intenso do que o observado no grupo OBIN (\*). Barra 100 µm. (J) Maior aumento da figura anterior mostrando as criptas hiperplásicas (setas largas), figuras de mitose nas criptas (cabeças de seta brancas), hiperplasia de células caliciformes (setas finas) e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (\*). Barra 50 µm. Vilosidade intestinal (V); *muscularis mucosae* (mm); la (lâmina própria); cr (cripta intestinal). Hematoxilina e Eosina.



### 5.3.6. *Quantificação das estruturas semelhantes a coroas (Crown-Like Structures – CLS)*

Na contagem de estruturas semelhantes a coroa, não foi observada diferença estatística entre os valores obtidos para cada um dos grupos experimentais, como pode ser visto na figura 11.



**Figura 11.** Estruturas em forma de coroa no tecido adiposo dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 5-6.

### 5.3.7. *Histopatologia e morfometria da esteatose hepática*

O fígado dos gerbils do grupo CT apresentou aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 12A). Em todos os gerbils do grupo CTIN foi observada esteatose difusa discreta, caracterizada pela presença de múltiplos pequenos vacúolos citoplasmáticos em imagem negativa localizados praticamente em todos os hepatócitos dos cortes analisados e, alguns vacúolos de tamanho maior que empurravam discretamente o núcleo para a periferia do hepatócito (Figura 12B). Já nos gerbils do grupo XCTIN, foi observada redução significativa dos vacúolos citoplasmáticos, encontrando-se vastas áreas de parênquima hepático de aspecto normal, intercaladas por algumas regiões com vacúolos citoplasmáticos de diferentes tamanhos (Figura 12C). Nos grupos OB, OBIN e XOBIN o aspecto morfológico observado foi semelhante. Em todos os gerbils destes grupos foi encontrada esteatose principalmente macrovesicular difusa intensa, caracterizada pela presença de hepatócitos

aumentados de tamanho, devido à presença, principalmente, de um vacúolo citoplasmático em imagem negativa que empurrava o núcleo totalmente para a periferia do hepatócito, juntamente com capilares colapsados (Figura 12D, 12E, 12F).

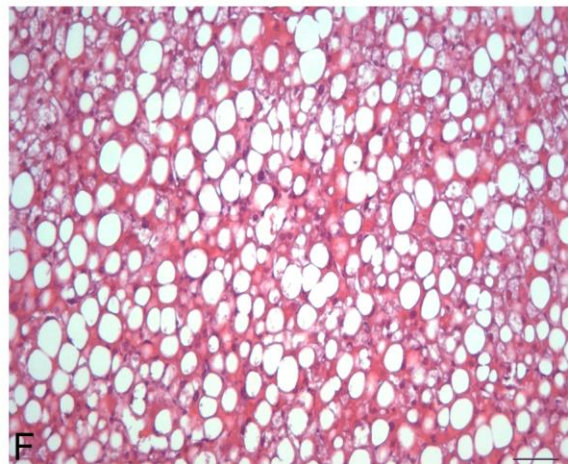
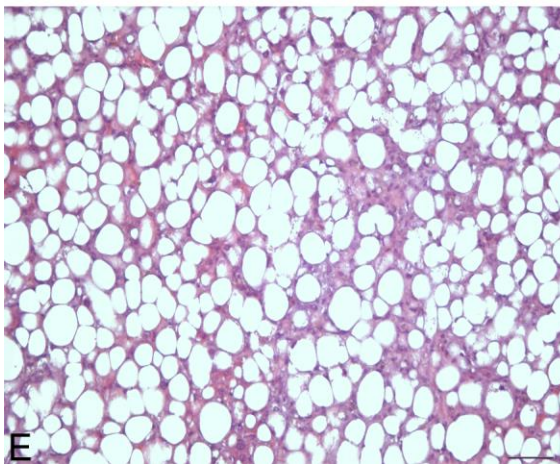
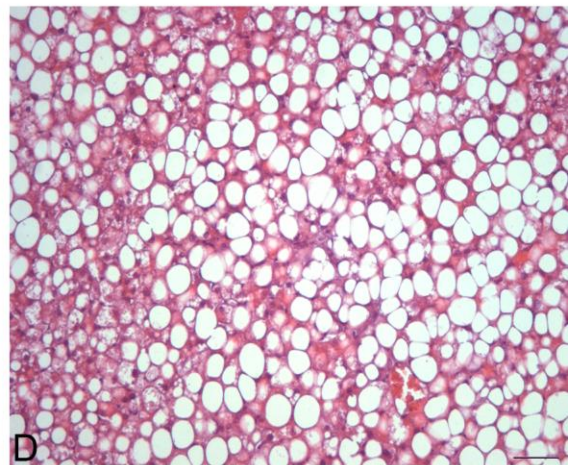
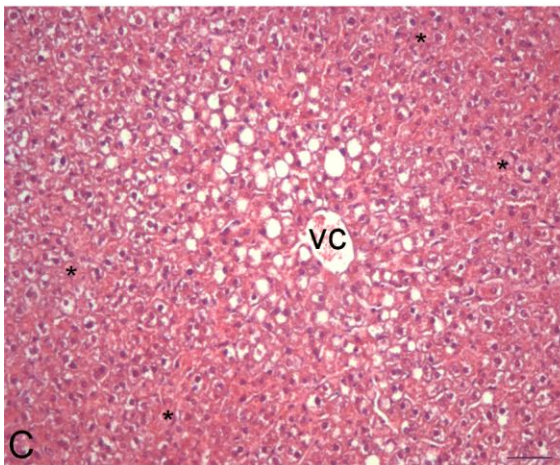
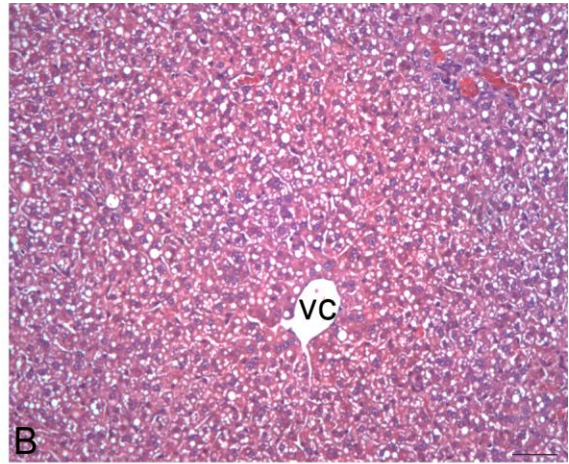
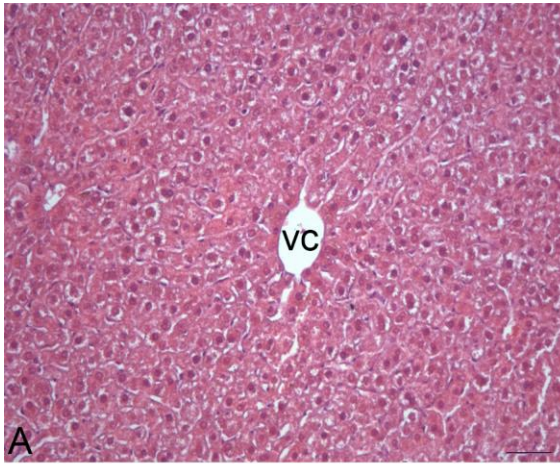
A tabela 7 mostra os resultados da avaliação da deposição de gordura no fígado dos gerbils dos grupos experimentais. Os gerbils obesos apresentaram maior deposição de gorduras, principalmente na forma de macrovesículas do que os animais alimentados com a dieta controle. Os animais controle infectados por uma semana (CTIN) apresentaram maior deposição de microvesículas de gordura no fígado do que os animais controle não infectados (grupo CT),  $p < 0,01$ , que parece ter regredido após duas semanas de infecção (grupo XCTIN).

**Tabela 7. Avaliação da deposição de gordura no tecido hepático dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 7.**

<b>GRUPOS</b>	<b>Área ocupada pelas Microvesículas (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Área ocupada pelas Macrovesículas (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Área Total ocupada por gordura (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
<b>CT (n=7)</b>	10557 $\pm$ 5329 <sup>a</sup>	7134 $\pm$ 5685 <sup>a</sup>	14101 $\pm$ 10212 <sup>a</sup>
<b>CTIN (n=7)</b>	54953 $\pm$ 5730 <sup>b</sup>	80023 $\pm$ 14442 <sup>a,b</sup>	134976 $\pm$ 9443 <sup>a,b</sup>
<b>XCTIN (n=7)</b>	27985 $\pm$ 10536 <sup>a,b</sup>	35367 $\pm$ 15264 <sup>a</sup>	63352 $\pm$ 25268 <sup>a</sup>
<b>OB (n=7)</b>	32761 $\pm$ 2913 <sup>a,b</sup>	375050 $\pm$ 33213 <sup>b</sup>	407811 $\pm$ 30903 <sup>b</sup>
<b>OBIN (n=7)</b>	39295 $\pm$ 3956 <sup>b</sup>	378852 $\pm$ 58373 <sup>b</sup>	377893 $\pm$ 57334 <sup>b</sup>
<b>XOBIN (n=7)</b>	30372 $\pm$ 4689 <sup>a,b</sup>	400630 $\pm$ 68921 <sup>b</sup>	431002 $\pm$ 65375 <sup>b</sup>

Quanto à área ocupada por macrovesículas e área total ocupada por gordura:

CT vs OB:  $p < 0,01$   
 CT vs OBIN:  $p < 0,01$   
 CT vs XOBIN:  $p < 0,01$   
 XCTIN vs OB:  $p < 0,05$   
 XCTIN vs OBIN:  $p < 0,05$   
 XCTIN vs XOBIN:  $p < 0,05$



**Figura 12. Fígado de gerbils dos grupos controle sem infecção (CT), controle infectado por 1 semana (CTIN), controle infectado por 2 semanas (CTIN) e obeso sem infecção (OB), obeso infectado por 1 semana (OBIN) e obeso infectado por 2 semanas (XOBIN).**

(A) Grupo CT. Fígado de aspecto normal. (B) Grupo CTIN. Esteatose discreta atingindo praticamente todos os hepatócitos, caracterizada pela presença de pequenos vacúolos citoplasmáticos em imagem negativa. (C) Grupo XCTIN. Redução da área de esteatose em relação ao grupo CTIN. Notar a presença de vários hepatócitos sem acúmulo de gordura (\*). Grupos OB (D), OBIN (E) e XOBIN (F). Esteatose intensa sem diferença entre estes grupos, caracterizada principalmente pela presença de grandes vacúolos citoplasmáticos em imagem negativa que empurram o núcleo para a periferia do hepatócito, aumentam o seu tamanho e comprimem os capilares sinusóides. Veia centrolobular (vc). Barra 100  $\mu$ m. Hematoxilina e Eosina.

## 6. DISCUSSÃO

Dietas ricas em gorduras e açúcares simples, geralmente ocasionam aumento do peso corporal, resultando na expansão do número e do volume de adipócitos (Hauner 2005). Conseqüentemente, há desregulação da atividade secretora do tecido adiposo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças metabólicas, alterando as respostas inflamatórias e o metabolismo de lipídios e da glicose (Lumeng & Saltiel, 2011). O aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) tem sido associado com maior risco e pior prognóstico para diversas infecções bacterianas (Hsu et al, 2007; Ordway et al, 2008; Mancuso 2010) e virais (Smith et al, 2007; Smith et al, 2009; Karjala et al, 2011). Quanto às infecções parasitárias, duas vertentes vem sendo consideradas: o agravamento da infecção decorrente das alterações advindas do tecido adiposo (Robert et al, 2008; de Carvalho et al, 2015; Cabalén et al, 2016; Sarnágli et al, 2016), e a modulação da adiposidade pelos parasitos, atenuando suas conseqüências (Yang et al., 2013; Hussaarts et al, 2015). Entretanto, não existem evidências que confirmem se este quadro ocorre também em enteroparasitoses não-invasivas como a giardíase. Até o presente momento, este é o primeiro estudo associando obesidade e infecção por *G. lamblia*. Neste contexto, o presente trabalho buscou contribuir no esclarecimento do assunto avaliando as alterações metabólicas, intestinais e imunológicas de gerbils da espécie *Meriones unguiculatus* experimentalmente infectados com *G. lamblia*, previamente submetidos à dieta hipercalórica/hiperlipídica, tendo em vista que este protozoário é, até o momento, considerado um parasito não-invasivo.

Dietas com elevado teor de lipídeos e calorias já são amplamente utilizadas na literatura como indutoras de obesidade (Von Diemen et al, 2006, Smith et al, 2007, Akagiri et al, 2008, Smith et al, 2009, Karlsson et al, 2010) mas, até o momento, não há relatos do emprego do gerbil da espécie *Meriones unguiculatus* como modelo experimental para estudo desta morbidade, sendo este portanto, o primeiro objetivo deste trabalho. Após a indução de obesidade, neste estudo, os gerbils alimentados com a dieta Hiper apresentaram muitas alterações típicas da doença, como aumento de peso corporal, dos pesos relativos do tecido adiposo e do fígado, dislipidemia, maior deposição hepática de gordura total, colesterol e triglicerídeos, além da alteração da produção de adipocinas. A dieta Hiper era rica em ácidos graxos saturados e monoinsaturados, com uma pequena razão de ácido graxo saturado/insaturado, quando comparada à dieta Controle. Surpreendentemente, nossos resultados mostraram que não houve diferença na ingestão calórica total entre os grupos controles e obesos mas, apesar disso, a ingestão de gorduras saturadas ou mono-saturadas foi significativamente maior. Este fato demonstra que o tipo de gordura na dieta é um fator

obesogênico primário, como já sugerido previamente (Crescenzo et al, 2015). Isso porquê os PUFA são preferencialmente oxidados e inibem a síntese *de novo* de ácidos graxos hepáticos e a expressão de genes lipogênicos, diminuindo o teor de gordura abdominal e a resistência periférica à insulina, em comparação com os SFA (Bjermo et al, 2012; Moussavi et al, 2008). Além disso, a oxidação da gordura é aumentada, conforme aumento na razão da ingestão de poliinsaturados/saturados (Moussavi et al, 2008), sendo que uma dieta rica em PUFA poderia ainda, promover a proliferação do crescimento do tecido adiposo marrom, bem como diminuição da regulação positiva da proteína 1 (Barqut et al, 2016). É por isso que as dietas ricas em ácidos graxos insaturados são consideradas menos nocivas para a saúde humana do que aquelas ricas em gordura saturada (Crescenzo et al, 2015). Em conjunto, estes resultados confirmaram o estabelecimento de obesidade no gerbil, tornando-o bom modelo para o estudo desta patologia associada ou não à infecção parasitária.

Nas fases iniciais da hipertrofia dos adipócitos, uma série de fenômenos como o estresse oxidativo, a hipóxia e a sub-regulação de algumas quimiocinas, iniciam o processo inflamatório neste tecido (Bost et al, 2005; Ito et al, 2007). No decorrer da obesidade, há ainda o recrutamento e ativação de outras células do sistema imunológico, como os macrófagos que, por sua vez, sofrem polarização do fenótipo M2 para M1, aumentando a secreção de várias citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a produção de fatores atenuadores da inflamação (Lumeng, Bodzin & Saltiel, 2007; Gregor & Hotamisligil, 2011; Jung & Choi, 2014; van Stijn et al, 2015). Macrófagos alternativamente ativados (M1), aumentam a secreção de TNF- $\alpha$  e estimulam a lipólise no tecido adiposo que, numa interação parácrina com os adipócitos, induzirão a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (Cawthorn & Sethi, 2008; Klop, Elte & Cabezas, 2013), e o aumento da síntese e da liberação de leptina (Paz-Filho et al, 2012) pelo tecido adiposo. Valores aumentados de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo, foram observados em nosso modelo experimental de obesidade, entretanto, sem alteração na quantidade de IL-6 ou leptina produzida neste tecido. A concentração de leptina em relação à massa adiposa em humanos, diminui à medida que fatores relacionados à síndrome metabólica se agravam, especialmente a hipertrigliceridemia (Paz-Filho et al, 2009) além disso, a produção desta adipocina é influenciada pela produção de IL-6 neste tecido (Trujillo et al, 2004). Assim, acredita-se que em gerbils, o aumento de TNF- $\alpha$  por si só, não foi capaz de induzir a maior produção de leptina, sendo talvez necessário o estímulo adicional de IL-6. Considerando-se a menor concentração de leptina e IL-6 em relação à massa adiposa, hipotetizamos que em gerbils, a hipertrigliceridemia, possa ter contribuído para estes achados, como já descrito em humanos.

A obesidade induzida pela dieta é caracterizada pela redução da produção de adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, que em condições normais é amplamente produzida pelo tecido adiposo (Golubović et al, 2013). Nosso modelo experimental de obesidade apresentou diminuição da concentração de adiponectina e de IL-10 no tecido adiposo. É sabido que esta adipocina atua na indução da expressão de IL-10, em macrófagos M2 (van Stijn et al, 2015), o que pode ter justificado os resultados encontrados.

Em animais obesos a maior liberação de AGL dos adipócitos estimulada pelo aumento de TNF (Clemente-Postigo et al, 2011) causa maior entrada de AGL no fígado que, por sua vez, terá maior produção de triglicerídeos (TGL) e secreção aumentada de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Klop et al, 2013), justificando a hipertrigliceridemia observada nos animais obesos. O acúmulo de lipídeos no fígado é potente estimulador da esteatose hepática (Donnelly et al, 2005), também verificado nos animais obesos deste estudo. Tomados em conjunto, as alterações decorrentes da obesidade encontradas neste trabalho, como a hipertrigliceridemia, o aumento de citocinas que induzem a lipólise, aumento da inflamação local e diminuição de adipocinas que regulam a inflamação, além da esteatose hepática, é possível afirmar que o uso deste modelo experimental, já consolidado para o estudo da giardíase, pode ser empregado para o estudo da obesidade. Entretanto, como o objetivo principal deste estudo foi avaliar a influência da infecção parasitária neste perfil metabólico e imunológico, os resultados devem ser analisados em toda sua amplitude.

Durante uma infecção, o organismo precisa elaborar uma resposta imunológica e sustentá-la, para completa eliminação do agente infeccioso. A primeira linha de defesa contra patógenos invasores é a resposta imune inata que detecta e limita a infecção. Além disso, a resposta inata também contribui para o desenvolvimento da resposta imunitária adaptativa, o que dá origem à memória imunológica (McDade et al, 2016). Neste trabalho, observamos que a infecção por *G.lambli*a causou impactos diferentes de acordo com o estado nutricional prévio dos animais, sendo muito mais prejudicial nos animais obesos.

Nos animais que se alimentaram da dieta Controle, na primeira semana após o inóculo, alta intensidade de parasitos foi observada no intestino delgado. Neste momento, a infecção causou efeitos deletérios no tecido local, que pôde ser confirmado pelo aumento de infiltrado inflamatório na lâmina própria, aumento da profundidade das criptas e por consequência, diminuição da razão vilosidade:cripta em mais de 30%. Mesmo sendo uma infecção majoritariamente assintomática (Adam 2001), a giardíase, em alguns indivíduos, pode causar uma série de danos na mucosa como a apoptose de enterócitos, rompimento de junções

firmes, seguidos de encurtamento das vilosidades concomitante à hiperplasia das criptas (Scott et al, 2004; Troeger et al, 2007; Behera et al, 2008; Koot et al, 2009). Além disso, apesar dos estudos histológicos da mucosa do intestino delgado, muitas vezes não demonstrarem nenhuma anormalidade aparente, o aumento de infiltrados linfocitários e a diminuição da razão vilosidade-cripta foram descritos em algumas crianças (Koot et al, 2009), além da presença de inflamação em alguns adultos tanto na infecção aguda (Hanevik et al, 2007) como na crônica (Troeger et al, 2007). O encurtamento difuso das microvilosidades epiteliais, poderá levar à redução na secreção de dissacaridases (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011) e hipersecreção de ânions, contribuindo com os prejuízos na absorção de lipídeos (Bansal et al, 2005) e demais manifestações clínicas da doença (Jimenez 2000; Buret 2008; O'Hara & Buret, 2008; Koot et al, 2009). Neste trabalho, no entanto, não observamos alterações decorrentes da má absorção de nutrientes, como perda de peso ou excreção de lípidos nas fezes, nos animais controle infectados, por uma ou duas semanas.

Entretanto, após a primeira semana de infecção parasitária, os animais do grupo CTIN demonstraram alterações sistêmicas como o depósito de microvesículas de gordura no fígado e ainda, um perfil pró-inflamatório no tecido adiposo, com aumento de TNF- $\alpha$  e diminuição de IL-10 e adiponectina. Curiosamente, relatos sobre a deposição de lipídeos nos hepatócitos foram descritos raras vezes nas décadas de 80 e 90, com apenas dois estudos relatando a associação entre giardíase e esteatose hepática. O primeiro, realizado por Sotto & Gra (1985), avaliou a função hepática de 25 pacientes com diagnóstico de giardíase. Destes, 60% dos pacientes apresentaram alterações da histologia hepática, sendo 36% de esteatose e 24% de lesões inflamatórias, três casos de hepatite crônica persistente, sendo que em dois deles a hepatite crônica era ativa. A regressão das lesões hepáticas foi obtida apenas com o tratamento antiparasitário e, em alguns casos, o reaparecimento das lesões dependiam de reinfecções com o parasito. Em 1990, Sotto et al., avaliaram as implicações da giardíase no parênquima hepático, utilizando 20 ratos infectados com *Giardia muris* (nos quais foi feito estudo histológico do fígado), e 25 pacientes com giardíase que tinham níveis elevados de alanina-aminotransferase e que não possuíam marcadores positivos para hepatite B, colelitíase ou histórico de uso de drogas ou álcool. Os autores encontraram lesões hepáticas inespecíficas em 20% dos animais. Nos pacientes, a biópsia hepática demonstrou lesão hepática em 94% dos pacientes (sendo 20 casos de lesões celulares e 12 casos de lesões inflamatórias), que regrediram no terceiro mês de tratamento.

Nos últimos anos, vem surgindo uma ampla gama de estudos associando alterações no organismo a danos ao epitélio intestinal, uma vez que a microbiota exerce inúmeras funções



no organismo além de barreira física contra patógenos (Quigley et al, 2013; Jiang et al, 2015). Tendo em vista que o intestino e o fígado estão ligados pelo sistema venoso portal e ainda, que o sangue portal, contém não só os produtos de digestão, mas também produtos microbianos derivados de microrganismos que colonizam o intestino, o parênquima hepático se torna o primeiro local de exposição e filtração para tais produtos depois do intestino (Duseja & Chawla 2014). Sendo assim, alterações na membrana intestinal tornam o fígado mais vulnerável à translocação de bactérias, produtos bacterianos, endotoxinas ou citocinas segregadas.

A associação entre lesão ao epitélio intestinal, super crescimento de microrganismos e esteatose hepática já foi observada previamente tanto em modelos animais, como em humanos. Gäbele et al. (2011) induziram a esteatose hepática não-alcóolica (EHNA) em camundongos C57BL/6 alimentando-os com dieta rica em gordura e, em seguida, estudaram os efeitos da exposição destes animais a 1% de sulfato de sódio dextrano. A lesão intestinal causada pela administração combinada de dieta rica em gordura e de sulfato de sódio dextrano, além de agravar a esteatohepatite, também induziu resposta pró-fibrogênica no fígado. Os autores verificaram que a indução da inflamação intestinal por sulfato de sódio dextrano, danificou a barreira intestinal e permitiu a translocação de lipopolissacarídeos (LPS) com consequente inflamação hepática e fibrogênese. Miele et al (2009), ao estudarem a permeabilidade intestinal em 35 pacientes com doença hepática gordurosa não-alcóolica (DGHNA), correlacionaram este fenômeno à integridade das junções firmes e a prevalência de supercrescimento bacteriano no intestino delgado, comparando estes indivíduos a pacientes com doença celíaca não tratada (como um modelo de hiperpermeabilidade intestinal) e com indivíduos saudáveis. Estes autores demonstraram que os pacientes com DGHNA tiveram maior permeabilidade intestinal e maior crescimento bacteriano em comparação com indivíduos saudáveis, embora ambos tenham sido menores do que nos pacientes celíacos não tratados, evidenciando que a esteatose hepática em seres humanos está associada com aumento do crescimento bacteriano no intestino e consequente ruptura das junções firmes e aumento da permeabilidade intestinal.

No presente trabalho, embora a infecção não tenha aumentado a área total de gordura no fígado nos animais do grupo controle (Grupo CTIN), a análise da extração de lipídeos, juntamente com a morfometria mostraram que houve deposição de lipídeos no fígado na forma de microvesículas após a primeira semana de infecção. Esse acúmulo ocorreu em sinergia com maior parasitismo no epitélio intestinal destes animais, regredindo com maior tempo de infecção, como foi visto após duas semanas. Sabendo-se que a *Giardia lamblia* é

capaz de lesar as junções firmes (Chin et al, 2002; Panaro et al, 2007; Jenkins et al, 2009; Maia-Brigagão et al, 2012) e que estas junções desempenham papel importante na manutenção da integridade da barreira intestinal, a ocorrência de super crescimento de microrganismos, como a *Giardia*, no lúmen intestinal pode acarretar em maior passagem de bactérias, produtos bacterianos, endotoxinas e inflamação local, sendo um dos fatores chave para o acúmulo lipídico no fígado, observado na giardíase.

Além do acúmulo de lipídeos no parênquima hepático, alterações no perfil inflamatório no tecido adiposo de gerbils do grupo controle infectados por uma semana (CTIN) também foram observadas, como aumento de TNF- $\alpha$ , que começou a diminuir na segunda semana de infecção (XCTIN). Simultaneamente, houve diminuição da concentração de IL-10, que começou a aumentar nos gerbils infectados por duas semanas. A composição celular do tecido adiposo não é homogênea, sendo composta por inúmeros tipos celulares como células tronco mesenquimais, células T reguladoras, células precursoras endoteliais, pré-adipócitos, assim como macrófagos M2, as quais são conhecidas por fração do estroma vascular do tecido adiposo (Mathis 2013). Considerando-se que a maioria são células do sistema imunitário, o tecido adiposo pode também desempenhar papel importante na resposta imune, seja pelo efeito direto das células imunitárias residentes no tecido, ou indiretamente, pela modulação da resposta imune de forma endócrina e/ou parácrina (Desruisseaux et al, 2007; Mathis 2013). Muito já tem sido estudado sobre os efeitos que tais populações celulares podem exercer no organismo de um indivíduo obeso (Cawthorn & Sethi, 2008; Clemente-Postigo et al, 2011; Golubović et al, 2013; Jung & Choi, 2014; van Stijn et al, 2015). Entretanto, pouca atenção tem sido direcionada à resposta imunológica de hospedeiros de peso adequado acometidos por doenças infecciosas (Desruisseaux et al, 2007). Estudos recentes tem demonstrado que protozoários invasivos como o *Trypanosoma cruzi* (Nagajyothi et al, 2012) e *Neospora caninum* (Teixeira et al, 2015) são capazes de invadir o tecido adiposo nos primeiros estágios de infecção, provocando respostas imunológicas e alterações metabólicas tanto locais como sistêmicas. Entretanto, não há pesquisas que avaliem se antígenos parasitários seriam capazes de desencadear as mesmas respostas. Atualmente vem sendo demonstrando o potencial invasivo de trofozoítos de *G. lamblia* (Martinez- Gordillo et al, 2014; Reynoso-Robles et al, 2015), contrariando o conceito estabelecido de que este parasito habitaria apenas o lúmen e junto às microvilosidades do intestino (Chin et al, 2002; Troeger et al, 2007; Buret 2008). Considerando-se estes achados, é possível que as alterações encontradas no tecido adiposo dos animais do grupo controle infectado, principalmente após uma semana de infecção, sejam decorrentes da presença de produtos do parasito, ou até

mesmo do próprio parasito neste tecido, sendo ainda necessários futuros estudos para comprovar esta hipótese.

Apesar das relevantes alterações desencadeadas no organismo hospedeiro após uma semana de infecção, os animais do grupo controle foram capazes de desencadear uma resposta inflamatória rápida e sustentada por mais de uma semana, caracterizada principalmente pelo aumento da produção das citocinas IL-2, IL-5 e IL-6, e por uma resposta oxidativa mais eficaz, demonstrada pela maior concentração de TBARS no intestino.

As citocinas desempenham papel importante na imunidade da mucosa, regulando a barreira intestinal, a migração e ativação de células imunitárias além do metabolismo celular, com o fim de manter um ambiente homeostático (Elshaera & Beguna, 2016). As fontes principais de citocinas no intestino são células mononucleares, incluindo linfócitos transientes e residentes e macrófagos, células dendríticas, células polimorfonucleares, células linfóides inatas, bem como células epiteliais intestinais e as células do estroma (Elshaera & Beguna, 2016). No presente trabalho, o infiltrado inflamatório encontrado na lâmina própria dos animais infectados, obesos ou não, foi predominantemente constituído por células mononucleares, especialmente por linfócitos, seguidos dos macrófagos, além de quantidade aumentada de eosinófilos, células que certamente foram essenciais na depuração do parasito.

Os dados relativos à resposta imunológica do hospedeiro na infecção por *Giardia lamblia* são extremamente variados e controversos, uma vez que os estudos utilizam modelos experimentais e cepas do trofozoíto diferentes. No nosso trabalho, foi possível observar que todos os animais dos grupos controle ou obeso infectados apresentaram aumentada concentração intestinal de IL-6 nos momentos iniciais da infecção por *Giardia lamblia*. O papel fundamental da citocina IL-6 na indução de respostas celulares inatas e também na mediação da produção de anticorpos específicos já é bem descrito na giardiase (Kimura et al, 2007; Scheller et al, 2011), sendo que camundongos deficientes em IL-6 não são capazes de eliminar o parasito (Bienz et al, 2003; Kamda et al, 2012). Além de IL-6, as citocinas IL-5 e IL-2, também aumentaram nos animais com uma e duas semanas de infecção (grupos CTIN e XCTIN). Níveis aumentados destas citocinas já foram relatados durante infecções por *Giardia* tanto em humanos como em modelos animais (Bayraktar et al, 2005; Matowicka-Karna et al, 2009; Matowicka-Karna et al, 2011; Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011; Jimenez et al, 2014), mas a função específica destas citocinas na infecção ainda não foi bem estabelecida.

A IL-5, é uma citocina produzida pelas células T helper do tipo 2 e pelos mastócitos. Suas funções são principalmente, estimular a produção de células B, aumentar a secreção de

imunoglobulinas, além de ser a citocina mais importante na ativação de eosinófilos. O papel essencial de IL-5 nas infecções intestinais por helmintos já é bem descrito, sendo que esta citocina atua induzindo a ativação de eosinófilos que participarão na eliminação dos parasitos por efeitos citotóxicos (Rosenberg et al, 2013). Em humanos, já foi demonstrado também que a eosinofilia não se limita apenas às infecções helmínticas, atuando também na infecção por protozoários, como a *Giardia lamblia* (Ustun et al, 2004), sendo sua associação com manifestações alérgicas já de longa data (Di Prisco et al, 1998; Zalipaeva 2002; Halliez & Buret, 2013). Nossos achados demonstram além das maiores concentrações de IL-5, a presença de eosinófilos no infiltrado inflamatório da lâmina própria, que podem também ter contribuído com a supressão da infecção. Outras células como os mastócitos, podem ser relevantes nesta fase da defesa imunológica, tendo em vista a relevância que os mastócitos tem na defesa inata contra a giardíase (Li et al, 2004; Merluzzi et al, 2010), podendo-se inferir que a presença de IL-5 no início da infecção poderia ser oriunda também destas células. Considerando-se que mastócitos de indivíduos saudáveis não produzem IL-5, mas os de pacientes com doença inflamatória intestinal (IBD) liberam quantidades relativamente grandes desta citocina (Levy, 2004), os mastócitos e os seus mediadores inflamatórios tem sido intimamente associados à IBD, sendo sugerido que os agentes microbianos, incluindo os parasitos possam aumentar o número de mastócitos na parede intestinal, aumentando o número de células inflamatórias que podem causar IBD (He 2004). Esta teoria justificaria alguns dos efeitos crônicos já relatados na giardíase, como por exemplo, a síndrome do intestino irritável pós-infecção por *Giardia lamblia* (Hanevik et al, 2014).

Durante uma resposta imunológica, a interleucina-2 (IL-2) é produzida rapidamente principalmente por linfócitos TCD4+ ativados após apresentação de antígenos pelas células dendríticas (DC) em órgãos linfóides secundários, como os linfonodos (Boyman & Sprent, 2012). No entanto, já foi demonstrado que as próprias células dendríticas seriam capazes de produzir e secretar esta citocina nos instantes iniciais de contato com agentes patogênicos, sendo sua liberação importante no estímulo da proliferação de células da mucosa como linfócitos, células NK e macrófagos (Granucci et al, 2003). Seu papel era atribuído apenas à modulação do crescimento de imunócitos, no entanto, receptores funcionais de IL-2 foram identificados em várias linhagens de cultura de células intestinais (Ciacci et al, 1993; Reinecker & Podolsky, 1995), atribuindo à IL-2 também a função de modulação do epitélio, atuando na secreção de íons e na proliferação celular, por exemplo (O'Loughlin et al, 2001). Nos nossos animais controle após a primeira semana de infecção, foi visto maior secreção dessa citocina que reduziu após a segunda semana de infecção devido à possível ativação de

células específicas. O papel das células dendríticas como células apresentadoras de antígenos na giardíase já foi relatado previamente na literatura (Rescigno et al, 2001; Castro-Sanchez & Martin-Villa 2013) além de sua importância na produção de IL-6 (Lee et al, 2014). A partir dos resultados aqui encontrados, podemos supor que o papel destas células na infecção por *Giardia* não deve se limitar à produção da citocina IL-6, mas também de IL-2, considerando-se a rápida elevação que esta última citocina apresentou nos animais infectados.

À medida que a infecção evoluiu, a resposta imune adaptativa também começou a ser elaborada, como pôde ser visto pelo aumento na concentração de citocinas na cultura de células do baço. A julgar pela produção inicial de IL-2, IL-5 e IL-4 juntamente com o aumento significativo de IL-13 nas células esplênicas, podemos considerar que a giardíase estimulou uma resposta do tipo Th2, contrariando o que é descrito na literatura, mesmo com o aumento significativo da citocina IL-6. Mesmo não havendo estudos que demonstrem esse tipo de polarização na resposta imune na giardíase, os nossos resultados demonstram que os animais foram capazes de controlar a infecção a partir desta resposta desencadeada.

No intestino delgado, além das citocinas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) também pode ser auxiliar na resposta contra o parasito. Esses produtos podem ser utilizados pelo sistema imune inato, como nas células epiteliais do intestino delgado, por exemplo, por sua atividade citotóxica sobre agentes patogênicos, contribuindo para a manutenção da barreira mucosa (Witthoft et al, 1998, Eckmann et al, 2000). Nos animais do grupo controle infectados por uma semana (CTIN), houve maior produção de malonaldeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, que pode ter atuado toxicamente contra os parasitos, porém não foi observado esgotamento das enzimas antioxidantes SOD e catalase. Entretanto, no fígado, houve redução de SOD na primeira semana de infecção, que foi prontamente reestabelecida na semana seguinte. O consumo destas enzimas nos hepatócitos, indicativo de estresse oxidativo, foi concomitante ao período de maior infecção parasitária nos animais controle e à deposição de gordura no fígado, fatores que podem ter sido responsáveis pela maior produção de ROS. Uma vez que o organismo hospedeiro foi capaz de controlar a progressão da infecção, as alterações decorrentes da mesma também começaram a ser resolvidas, inclusive no fígado. Assim, nossos achados demonstraram que essa resposta conjunta nos animais do grupo controle foi capaz de conter a progressão da giardíase, sendo visto que, após a segunda semana de infecção, o parasitismo diminuiu, e concomitante a isso, as alterações inicialmente vistas, não progridem, como pode ser verificado na análise das criptas e vilosidades intestinais, ou até regridem, conforme resultados da deposição de lipídeos e estresse oxidativo hepáticos, e na inflamação do tecido adiposo.

Em contrapartida, nos animais obesos a resposta à infecção foi prejudicada. O mecanismo exato responsável por alterações no sistema imunológico de pacientes obesos é desconhecido, mas pode estar relacionado com os efeitos negativos que alterações nutricionais, metabólicas e endócrinas ocasionam nas funções de diferentes células do sistema imunológico (Moulin et al, 2009). Ao contrário dos animais do grupo controle, os obesos não conseguiram estabelecer uma resposta eficaz à giardíase sete dias após infecção e então, após a segunda semana, o parasitismo aumentou vigorosamente assim como o infiltrado inflamatório na mucosa e na submucosa duodenal, tornando as lesões ao epitélio ainda mais graves. Pode-se observar que após a primeira semana de infecção, não há nenhuma alteração de IL-5, há diminuição de IL-13, aumento de IL-6 e de IL-2 no intestino, que não são sustentados por mais uma semana, bem como a resposta antioxidante vista nestes animais, o que sugere que a resposta imunológica no obeso possa estar entrando em um estado de exaustão precoce e, com isso, não consegue combater o parasitismo. Assim, obesos após a segunda semana de infecção, apresentaram maiores danos como parasitismo e infiltrado inflamatório abundantes, com consequente encurtamento de vilosidades e hiperplasia de criptas, aumentando ainda mais a razão vilosidade:cripta, que ultrapassou os 50% de redução, em relação ao controle não infectado. Como os animais não apresentaram menor ingestão, as consequências ao dano epitelial, levaram aos sintomas clássicos da giardíase (Adam 2001), como esteatorreia e perda de peso. Já é descrito na literatura que tanto a obesidade quanto a dieta hiperlipídica aumentam a permeabilidade intestinal (Cani et al, 2008). Várias hipóteses já foram propostas para justificar este fato, como por exemplo a redução na expressão das proteínas das junções firmes, como claudinas, ocludinas e zônula ocludina 1 (Suzuki & Hara 2010). A persistência dos altos níveis de citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo pode também modificar as proteínas das junções firmes, causando desequilíbrio na função de barreira intestinal (Brun et al, 2007), uma vez que essas proteínas também regulam o transporte seletivo de íons, solutos e peptídeos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Ainda assim, os mecanismos pelos quais a obesidade leva ao aumento da permeabilidade intestinal ainda não estão bem esclarecidos. Acredita-se que a obesidade induzida por dieta em associação à giardíase, pode intensificar o dano nas junções firmes, aumentando ainda mais a permeabilidade intestinal e o influxo de patógenos ou seus derivados para a circulação sistêmica, resultando em ativação de vias inflamatórias de órgãos periféricos (Wang et al, 2010).

No fígado, é possível verificar que a infecção agravou o estresse oxidativo, uma vez que houve redução da atividade das enzimas antioxidantes neste órgão. A atividade da enzima

catalase, enzima antioxidante amplamente encontrada no fígado, diminuiu tanto com a infecção por *Giardia lamblia* como com a obesidade, porém esta redução foi ainda mais acentuada na associação de ambas as doenças (grupos OBIN e XOBIN), sugerindo que o estresse oxidativo foi reflexo tanto da dieta, que causou esteatose, como também da infecção parasitária. Alterações na deposição hepática de lipídeos como consequência da giardíase não puderam ser analisadas nos animais obesos infectados nestes animais, possivelmente por serem muito sutis em relação àquelas provocadas pela obesidade. As alterações na atividade das enzimas antioxidantes hepáticas são de suma importância, uma vez que a esteatose, muitas vezes, é apenas um gatilho inicial para uma série de agravos no fígado, como por exemplo a esteatohepatite não alcoólica (NASH) e por conseguinte a cirrose hepática (Tilg & Moschen, 2010). Isso porque, na esteatose, os hepatócitos são mais suscetíveis à ação de toxinas bacterianas derivadas do intestino, à disfunção mitocondrial, à apoptose desregulada, ao estresse oxidativo, à ação de citocinas pró-inflamatórias e de adipocinas, e à ativação de fatores pró-fibrogênicos, que levarão à progressão da doença neste tecido (Tarantino et al, 2010; Polyzos et al, 2012). Assim, à medida que a doença hepática progride, há redução ainda maior da capacidade antioxidante do fígado, demonstrado pela redução significativa na atividade de catalase e superóxido dismutase, chegando a uma redução sistêmica da capacidade antioxidante do organismo nas últimas fases da esteatohepatite, conforme demonstrado em estudo realizado com pacientes portadores de NASH (Videla et al, 2004). Considerando-se o maior dano visto no epitélio intestinal dos animais obesos infectados, somado à maior suscetibilidade do parênquima hepático repleto de lipídeos, a redução da atividade hepática das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase verificada neste trabalho, pode refletir o estado transitório entre a EHNA e a NASH, sendo possível que, com o decorrer do tempo, o maior estresse oxidativo no fígado dos animais obesos, desencadeasse as manifestações mais graves de doença hepática.

No tecido adiposo, a giardíase alterou momentaneamente o perfil inflamatório característico da obesidade, diminuindo significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  nos dois grupos infectados (OBIN e XOBIN), além de aumentar a concentração de IL-10 em OBIN. Ainda assim, estes animais não conseguiram reestabelecer a concentração de adiponectina.

Inúmeras evidências vêm demonstrando que indivíduos obesos contraem infecções com maior frequência, apresentam maior gravidade das infecções, tem pior prognóstico e mais complicações pós-cirúrgicas (Mancuso 2002; Potapov et al, 2003; Wieland et al, 2005; Hsu et al, 2007; Smith et al, 2007; Ordway et al, 2008; Ylöstalo et al, 2008; Davenport et al, 2009; Smith et al, 2009; Karlsson et al, 2010; Mancuso 2010; Akiyama et al, 2011; Jain &

Chaves, 2011; Karjala et al, 2011; Kwong et al, 2011). Tanto alterações metabólicas como inflamatórias no tecido adiposo durante a obesidade tem sido associadas ao desenvolvimento de certas doenças, no entanto, apesar da presença de células de linhagem hematopoiéticas no tecido adiposo, atualmente pouco se sabe se este tecido apresenta papel direto na defesa do hospedeiro contra patógenos (Falagas & Kompoti 2006).

Alguns estudos já demonstraram alterações da função imune celular em indivíduos obesos em comparação com os de peso adequado, como a supressão da atividade e da proliferação de linfócitos T e B frente à estimulação policlonal (Nieman et al, 1999). Além disso, já foi também demonstrado em camundongos C57BL/6 que a obesidade induzida por dieta reduziu a contagem de timócitos, aumentou significativamente a apoptose de populações de células T em desenvolvimento e levou à redução de células T *naive* periféricas, aumentando a frequência de células efetoras de memória (Yang et al, 2009). As células natural killer (NK), células dendríticas e células T CD8+ também podem ter suas funções debilitadas pelo excesso de gordura corporal, acarretando em maior morbidade e mortalidade durante a infecção primária ou secundária pelo vírus influenza, como foi demonstrado por estudos realizados com camundongos submetidos à dieta indutora de obesidade (Smith et al, 2007, Smith et al, 2009, Karlsson et al, 2010). Certamente, estes estudos demonstram que a obesidade pode resultar em prejuízo na defesa do hospedeiro, aumentando o risco de infecção.

De maneira semelhante, alguns estudos também já demonstraram o papel essencial da leptina na defesa imunológica, uma vez que camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) ou do seu receptor (*db/db*) tiveram maior a susceptibilidade à infecções bacterianas e à pneumonia devido à possível deficiência da fagocitose de macrófagos alveolares (Mancuso et al, 2002; Mancuso, 2010). Ao mesmo tempo, outro estudo demonstrou que, injeções intraperitoneais de leptina antes da infecção por *Streptococcus pneumoniae*, aumentou a sobrevivência de camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) após o desafio bacteriano, o que não foi observado nos animais selvagens (Hsu et al, 2007). Em contrapartida, Robert et al. (2008), trabalhando com os mesmos camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) e infectados com *Plamodium bergeri*, demonstraram que estes animais não desenvolveram malária cerebral e atribuíram este achado à ausência de leptina, uma vez que este hormônio é mediador da resposta inflamatória exacerbada.

Apesar destes e de outros inúmeros estudos já evidenciarem a clara interferência da obesidade na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, nenhum deles direciona os mecanismos exatos pelos quais o excesso de gordura corporal poderia realmente dificultar a



resposta imunológica. Acreditamos que a obesidade possa ter influenciado a resposta inata contra a infecção por *Giardia*, tornando o animal infectado incapaz de conter a progressão da doença. Além disso, a interação entre a obesidade e a giardíase pode ter provocado alteração de fenótipo de macrófagos no tecido adiposo (detectado pela diminuição significativa de TNF- $\alpha$  e aumento de IL-10), que também seria capaz de influenciar na falha da defesa imunológica destes animais. No entanto, ainda são necessários mais estudos buscando esclarecer quais seriam as interações clinicamente relevantes entre o excesso de tecido adiposo, as alterações metabólicas e o pior desempenho das células imunológicas, desvendando os mecanismos pelos quais a obesidade contribui para o aumento da suscetibilidade de determinadas doenças infecciosas, como a giardíase.

## 7. CONCLUSÕES

Os gerbils da espécie *Meriones unguiculatus* são modelos efetivos para estudo da obesidade induzida pela dieta, reproduzindo muito bem as alterações da doença no tecido adiposo e, especialmente as alterações hepáticas.

A associação entre a obesidade e a giardíase não influenciou no ganho de peso nem no consumo alimentar dos animais, sendo que estes parâmetros foram influenciados apenas pelo tipo de dieta, especialmente a dieta Hiper, que continha elevados teores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. No entanto, a combinação das duas doenças ocasionou alterações metabólicas, imunológicas e morfométricas no intestino delgado e fígado dos gerbils, além de maior deposição de lipídeos no fígado, maior excreção de gorduras nas fezes e mudança no tipo de adipocinas secretadas. Houve ainda a uma maior intensidade de parasitismo no intestino delgado e além disso, prejuízo na contenção do processo infeccioso por *Giardia lamblia* nestes animais.

Tomados em conjunto, esses dados mostram a importância do controle da obesidade, visando reduzir o estado inflamatório que agrava a evolução de doenças infecciosas, como a giardíase. Acreditamos que este trabalho poderá contribuir com novas iniciativas de saúde pública, enfatizando a importância de se estabelecer políticas mais eficazes para a prevenção e controle da obesidade, especialmente em crianças, maiores atingidos pela giardíase, considerando-se que a infecção, nesta faixa etária, pode causar déficits graves nestes indivíduos.

## REFERÊNCIAS

- Abbas L & Rivolta MN. 2015. Aminoglycoside ototoxicity and hair cell ablation in the adult gerbil: a simple model to study hair cell loss and regeneration. *Hearing Research* 325: 12-26. DOI: 10.1016/j.heares.2015.03.002.
- Abe N & Teramoto I (2012). Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage at the rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitol Res*, 110: 1025-1028.
- Adam RD (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3):447–475.
- Adam RD, Dahlstrom EW, Martens CA, Bruno DP, Barbian KD, Ricklefs SM, Hernandez MM, Narla NP, Patel RB, Porcella SF, and Nash TE (2013). Genome Sequencing of *Giardia lamblia* Genotypes A2 and B Isolates (DH and GS) and Comparative Analysis with the Genomes of Genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol*, 5: 2498-2511.
- Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García 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.
- Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, Kokura S, Yoshikawa T (2008). A mouse model of metabolic syndrome; increase in visceral adipose tissue precedes the development of fatty liver and insulin resistance in high-fat diet-fed male KK/Ta mice. *J Clin Biochem Nutr*, 42:150–157. DOI: 10.3164/jcbn.2008022.
- Akiyama N, Segawa T, Ida H et al (2011). Bimodal effects of obesity ratio on disease duration of respiratory syncytial virus infection in children. *Allergol Int*, 60: 305–308.
- Al-Mekhlafi HM, Surin J, Sallam AA, Abdullah AW, Mahdy MAK (2010). Giardiasis and Poor Vitamin A Status among Aboriginal School Children in Rural Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(3): 523-527.
- Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME & Gillin FD (1994). Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun*, 62: 5397–5403.
- Alia SA & Hilla DR (2003). *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16:453–460.

- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 20: 470-475.
- Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M (2007). Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women. *ARYA. Atheroscler J*, 2:189–192.
- Angulo P (2007). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev*, 65:57–63.
- Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiology*, 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.
- Artiñano AA & Castro MM (2009). Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 102: 1246–53. DOI: 10.1017/S0007114509990729.
- Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y & Kono T (2004). The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol*, 12: 394–398.
- Bachur TP, Vale JM, Coêlho IC, Queiroz TR, Chaves CS (2008). Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis.*, 12(2): 115-122.
- Bakırcı S, Bilgiç HB, Köse O, Aksulu A, Hacılarlıoğlu S, Karagenç T, Çavuş İ, Özbilgin A. 2015. Gerbils, As Experimental Animals (*Meriones unguiculatus*): Is A Good Role Model for *Leishmania major*? *Turkish Journal of Parasitology* 39(3):212-7. DOI: 10.5152/tpd.2015.4300.
- Baldursson S & Karanis P (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res*, 45(20): 6603-6614.
- Banerjee D, Kumar PA, Kumar B, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob, J (2002). Determination of absolute hydrogenperoxide concentration by spectrophotometric method. *Curr. Sci.*, 83:1193-1194.

- Bansal D, Ahatti HS, Sehgal R (2005). Altered lipid parameters in patients infected with *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Giardia lamblia*. Br. J. Biomed. Sci., 62 (2):63-65.
- Bargut TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2016). Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. Tissue Cell 48(5):452-60. doi: 10.1016/j.tice.2016.08.001.
- Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab, 87(5):2084-9. DOI: 10.1210/jcem.87.5.8450.
- Basso RM, Silva-Ribeiro RT, Soligo DS, Ribacki SI, Callegari-Jacques SM, Zoppas BC (2008). Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among schoolchildren in Caxias do Sul, RS. Rev Soc Bras Med Trop., 41(3):263-268.
- Bayraktar MR, Mehmetb N, Durmaza R (2005). Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. Acta Tropica, 95(2):116-122.
- Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R (2005). Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in patients infected with *Giardia lamblia*. Turkiye Parazitol Derg, 29: 160–162.
- Bjermo H, Iggman D, Kullberg J, Dahlman I, Johansson L, Persson L, Berglund J, Pulkki K, Basu S, Uusitupa M, Rudling M, Arner P, Cederholm T, Ahlström H, Risérus U (2012). Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr.,95(5):1003-12. doi: 10.3945/ajcn.111.030114.
- Behera B, Mirdha BR, Makharia GK, Bhatnagar S, Dattagupta S, Samantaray JC (2008). Parasites in patients with malabsorption syndrome: a clinical study in children and adults. Dig. Dis. Sci. 53: 672–679.
- Belosevic M, Faubert GM, MacLean JD (1989). Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. Gut, 30:1213–1219.

- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL (2003). Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, 359:564-71.
- Bernander R, Palm JE, Svard SG (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.*, 3: 55–62.
- Berrilli F, Di Cave D, Cavallero S, D’Amelio S (2012). Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 141.
- Bienz M, Dai WJ, Welle M, Gottstein B & 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.
- Blanchard R (1888). Remarques sur le megastome intestinal. *Bull Soc Zool Fr*, 13:18.
- Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L (2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol*, 156:274–285.
- Blumberg RS, Lencer WI, Zhu X, et al (1999). Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol Lett*, 69: 7–11.
- Boadi S, Polley SD, Kilburn S, Mills GA, Chiodini PL (2014) A critical assessment of two real-time PCR assays targeting the (SSU) rRNA and *gdh* genes for the molecular identification of *Giardia intestinalis* in a clinical laboratory. *J Clin Pathol* 2014, 67:811-6.
- Bost F, Aouadi M, Caron L, Binetruy, B. 2005. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87:1–56. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.10.018.
- Boyman O & Sprent J (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 12(3):180-90. DOI: 10.1038/nri3156.
- Bradbury MW, Berk PD. 2004. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clinics in Liver Disease* 8:639–671. DOI: 10.1016/j.cld.2004.04.005.
- Brasil. (2015). *Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde – Brasília:

Ministério da Saúde. Disponível em:  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2014.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2014.pdf).

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

Broglia A, Weitzel T, Harms G, Cacció SM, Nöckler K (2013). Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers. *Parasitol Res*, 112:3449-56.

Brown DM, Upcroft JA, Edwards MR, Upcroft P (1998). Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol*, 28:149–164.

Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D. Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G518-525.

Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15:798-808. DOI:10.1038/oby.2007.608.

Buret AG (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite*, 15(15): 261-265.

Buret A, Gall DG, Olson ME (1990). Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and disaccharidase activity. *J. Parasitol*, 76:403–409.

Buret A, Hardin JA, Olson ME, Gall DG (1992). Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*, 103:506-13.

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

Byrd LG, Conrad JT, Nash TE (1994). *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun*, 62:3583-5.

Calle EE & Kaaks R (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Rev Cancer*, 4:579–591.

Cabalén ME, Cabral MF, Sanmarco LM, et al (2016). Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity model. *Oncotarget*, 7(12):13400-13415. DOI:10.18632/oncotarget.7630.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*;57:1470-1481.

Cardoso LV, Galisteu KJ, Schiesari Júnior A, Chahla LA, Canille RM, Belloto MV, Franco C, Maia IL, Rossit AR, Machado RL (2011). Enteric parasites in HIV-1/AIDS-infected patients from a Northwestern São Paulo reference unit in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44(6): 665-669.

Carranza PG & Lujan HD (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection*, 12: 71-80.

Cartwright CK, Ragland JB, Weidman SW, Sabesin SM (1982). Alterations in lipoprotein composition associated with galactosamine-induced rat liver injury. *J Lipid Res*, (23):667-679.

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

Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, da Silva Neto, LM, Salmazo CAA, Bóia MN (2007b). *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian amazon. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 49(3):147-153.

Castro-Sanchez P & Martin-Villa JM (2013). Gut immune system and oral tolerance. *Br J Nutr*, 109(Suppl 2): S3-S11.

Cawthorn WP, Sethi JK. 2008. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. *FEBS letters* 582(1):117-131. DOI:10.1016/j.febslet.2007.11.051.

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



- Char S, Cevallos AM, Yamson P, Sullivan PB, Neale G, Farthing MJ (1993). Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. *Gut*, 34:38-40.
- Chen TL, Chen S, Wu HW, et al (2013). Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathog*, 5: 26.
- Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG (2002). Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*, 70:3673–3680.
- Chochillon C, Gobert JG, Buchel LA, Savel J (1986). *Giardia intestinalis*: comparative study of lipid and nitrogen fecal excretions in adults and children with parasites. *Pathol Biol (Paris)*, 34(7):830-834.
- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, et al (2007). The implication of obesity on total antioxidant capacity apparently healthy men and women: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 17:590–597.
- Ciacci C, Mahida YR, Dignas A, et al (1993). Functional interleukin 2 receptors on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:527–32.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res*. 46: 2347–2355
- Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuno MI, Fernandez-Garcia D, Gomez-Huelgas R, Tinahones FJ, Cardona F. 2011. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. *PLoS One* 6:e24783. DOI: 10.1371/journal.pone.0024783.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol*, 41:925-933.
- Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G, Zarrelli A, Liverini G, Iossa S (2015). Fat Quality Influences the Obesogenic Effect of High Fat Diets. *Nutrients*, 16;7(11):9475-91. doi: 10.3390/nu7115480.

Davenport DL, Xenos ES, Hosokawa P, Radford J, Henderson WG, Endean ED (2009). The influence of body mass index obesity status on vascular surgery 30-day morbidity and mortality. *J Vasc Surg*, 49: 140–147.

Demirci M, Delibas N, Altuntas I, Oktem F, Yönden Z (2003). Serum Iron, Zinc and Copper Levels and Lipid Peroxidation in Children with Chronic Giardiasis. *J Health Popul Nutr*, 21(1):72-75.

de Carvalho RV, Soares SM, Gualberto AC, Evangelista GC, Duque JA, Ferreira AP, Macedo GC, Gameiro J. 2015. *Plasmodium berghei* ANKA infection results in exacerbated immune responses from C57BL/6 mice displaying hypothalamic obesity. *Cytokine*, 76(2):545-8.

den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA (2004). Hepatic Steatosis: A Mediator of the Metabolic Syndrome. Lessons From Animal Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:644-649.

Desruisseaux MS, Nagajyothi Trujillo ME, Tanowitz HB & Scherer PE (2007). Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infection and Immunity*, 75(3): 1066–1078. DOI: 10.1128/IAI.01455-06.

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

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

Díaz-Cinco ME, Ballesteros-Vázquez MN, Pérez-Morales R, Mata-Haro V (2002). Impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de *Giardia lamblia* en ratas Sprague-Dawley. *Salud Publica Mex* 44:315-322.

Dib HH, Lu SQ, Wen SF (2008). Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res* 103:239–251.

Dieterich S, Bielgk U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J (2000). Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation*, 101: 33-39.

Dobell C (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med*, 13:1–15.

- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115:1343–1351. DOI: 10.1172/JCI23621.
- Dreesen L, De Bosscher K, Grit G, et al (2014). *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infect Immun*, 82: 3333–3340.
- Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani JP, Schutz Y (2010). Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes*, 34(Suppl 2): S4–S17.
- Duseja A & Chawla YK (2014). Obesity and NAFLD- The Role of Bacteria and Microbiota. *Clin Liver Dis*, 18:59–71.
- Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Jukic L, Velagic V (2007). Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 13:4539–4550.
- Eckmann L, Laurent F, Langford D, et al (2000). Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol*, 164:1478-1487.
- Eckmann L (2003). Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology*, 25: 259-270.
- Elshaera D & Beguna J. The role of barrier function, autophagy, and cytokines in maintaining intestinal homeostasis. 2016. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.08.018. article in press.
- Escobedo AA, Almirall P, Alfonso M, Cimerman S, Chacín-Bonilla L (2014). Sexual transmission of giardiasis: A neglected route of spread? *Acta Tropica*, 132: 106–111.
- Falagas ME & Kompoti M (2006). Obesity and infection. *Lancet Infect Dis*, 6(7):438-46.
- Fantuzzi G (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 115(5):911-9. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.02.023.
- Feitosa G, Bandeira AC, Sampaio DP, Badaró R, Brites C (2001). High prevalence of Giardiasis and Strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 5(6): 339-344.

- Feng Y, Xiao L (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 24:110-40.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280(6):E827-47.
- Fleck SL, Hames SE & Warhurst DC (1985). Detection of *Giardia* in human jejunum by the immuno peroxidase method. Specific and non-specific results. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79:110–113.
- Folch J, Lees M, Stanley S (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, p:497-509.
- Furtado AK, Cabral VLR, Santos TN, Mansour E, Nagasako CK, Lorena SL, Pereira-Filho RA (2012). *Giardia infection: Protein losing enteropathy in an adult with immunodeficiency*. *World J Gastroenterol*, 18(19): 2430-2433.
- Gabele E, Dostert K, Hofmann C, et al (2011). DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol*, 55:1391–9.
- Gault MJ, Gillin FD & Zenian AJ (1987) *Giardia lamblia*: stimulation of growth by human intestinal mucus and epithelial cells in serum free medium. *Exp Parasitol* 64(1):29-37.
- Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol*, 50:679–705.
- Golubović MV, Dimić D, Antić S, Radenković S, Djindjić B, Jovanović M. 2013. Relationship of adipokine to insulin sensitivity and glycemic regulation in obese women--the effect of body weight reduction by caloric restriction. *Vojnosanitetski Pregled* 70(3):284-91.
- Gonçalves AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Yassaka MB, Moran LC et al (2009). Calicivirus and *Giardia lamblia* are associated with diarrhea in human immunodeficiency virus-seropositive patients from southeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 81(3): 463-466.
- Goyal N & 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 & 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.
- Granucci F, Feau S, Angeli V, Trottein F, Ricciardi-Castagnoli P (2003). Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol*, 170(10):5075-81.
- Grit GH, Devriendt B, Van Coppennolle S, et al (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.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. 2011. *Annual Reviews Immunology* 29:415- 45. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- Halliez MC & Buret AG (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*, 19: 8974–8985.
- Hanevik K, Hausken T, Morken MH, Strand EA, Mørch K, Coll P, Helgeland L, Langeland N (2007). Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J Infect*, 55:524-30.
- Hanevik K, Wensaas KA, Rortveit G, Eide GE, Mørch K, Langeland N (2014). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 6 years after *Giardia* infection: a controlled prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, 59:1394-400.
- Hardin JA, Buret AG, Oson ME, Kimm MH, Gall DG (1997). Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *J Parasitol*, 83:908–912.
- Hartwich J, Goralska J, Siedlecka D, Gruca A, Trzos M, Dembinska-Kiec A (2007). Effect of supplementation with vitamin E and C on plasma hsCPR level and cobalt-albumin binding score as markers of plasma oxidative stress in obesity. *Genes Nutr*, 2: 151-154.
- Hauer H. 2005. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proceedings of the Nutrition Society* 64:163–169. DOI: 10.1079/PNS2005428.
- Hawrelak J (2003). Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Altern Med Rev*, 8(2):129-142.

He SH (2004). Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 10: 309-318.

Hegde V & Dhurandhar NV (2013). Microbes and obesity-interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. *Clin Microbiol Infect*, 19: 314–320.

Hibi M, Oishi S, Matsushita M, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, Yasunaga K, Katsuragi Y, Kubota K, Tanaka S, Saito M (2016). Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes*. Aug 9. DOI: 10.1038/ijo.2016.124.

Hinney A, Vogel CIG, Hebebrand J (2010). From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *European Child & Adolescent Psychiatry* 19(3):297-310. DOI:10.1007/s00787-010-0096-6.

Hodges K & Gill R (2010). Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*, 11: 4-21.

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.

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.

Hsu A, Aronoff DM, Phipps J, Goel D, Mancuso P (2007). Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. *Clin Exp Immunol*, 150: 332–339.

Hussaarts L, García-Tardón N, van Beek L, Heemskerk MM, Haeberlein S, van der Zon GC, Ozir-Fazalalikhani A, Berbée JFP, van Dijk KW, van Harmelen V, Yazdanbakhsh M, Guigas B (2015). Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *FASEB J*, fj.14-266239. DOI:10.1096/fj.14-266239.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde (2013) - Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>.

Ito A, Suganami T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Takeya M, Kamei Y, Ogawa Y. 2007. Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. *The Journal of Biological Chemistry* 282:25445–25452. DOI: 10.1074/jbc.M701549200.

Ikejima S, Sasaki S, Sashinami H et al (2005). Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice. *Diabetes*, 54: 182–189.

Jain S & Chaves SS (2011). Obesity and influenza. *Clin Infect Dis*, 53: 422– 424.

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.

Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, Hu Y, Li J, Liu y (2015). Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports* 5:8096. DOI: 10.1038/srep08096.

Jimenez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M (2004). Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11:152–160.

Jimenez JC, Fontaine J, Creusy C, et al (2014). Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol Res*, 113: 2709–2718.

Jung UJ & Choi MS. 2014. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Science* 15:6184-6223. DOI: 10.3390/ijms15046184.

Júnior MF, Batista SA, Barbuto RC, Gomes AD, Queiroz DM, Araújo ID, Caliari MV. 2016. CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites produces increase of G cell and decrease of D cell in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Advances in Medical Sciences* 61(2):231-236. DOI: 10.1016/j.advms.2016.02.003.

- Júlio C, Vilares A, Oleastro M, Ferreira I, Gomes S, Monteiro L, Nunes B, Tenreiro R, Ângelo H (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites & Vectors* 5: 22.
- Kamda JD & 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 & Singer SM (2012). *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol*, 130: 288–291.
- Kanneganti TD & Dixit VD (2012). Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*, 13(8): 707-712.
- Karlsson EA, Sheridan PA, Beck MA (2010). Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. *J Immunol*, 184: 3127–3133.
- Karjala Z, Neal D, Rohrer J (2011). Association between HSV1 Seropositivity and Obesity: Data from the National Health and Nutritional Examination Survey, 2007–2008. *PLoS ONE* 6(5): e19092. doi:10.1371/journal.pone.0019092
- Keister DB (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 487–488.
- Khalkhal A, Haddar A, Semiane N, Mallek A, Abdelmalek A, Castex F, Gross R, Dahmani Y (2012). Obesity, insulin resistance and diabetes in the sand rat exposed to a hypercaloric diet; possible protective effect for IL1- $\beta$ . *Comptes Rendus Biologies* 335: 271–278. DOI:10.1016/j.crv.2012.03.003.
- Kimura A, Naka T & 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.
- Klop B, Elte JW, Cabezas MC. 2013. Dyslipidemia in obesity: Mechanisms and potential targets. *Nutrients* 5:1218–1240. DOI: 10.3390/nu5041218.
- Kodama M, Murakami K, Fujioka T. 2004. Animal models for the study of Helicobacter-induced gastric carcinoma. *Journal of Infection and Chemotherapy* 10(6):316-25. DOI: 10.1007/s10156-004-0353-Z.



- Kofoed CA & Christensen EB (1915). On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). Univ Calif Publ Zool, 16:30–54.
- Kofoed CA & Christensen ED. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates. Univ Calif Publ Zool, 20: 160.
- Koudela B & Vitovec J (1998). Experimental giardiasis in goat kids. Vet Parasitol, 74: 9–18.
- Koh WH, Geurden T, Paget T, O’Handley R, Steuar RF, Thompson RCA, 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, 99:353-8.
- Koot BGP, ten Kate FJW, Juffrie M, Rosalina I, Taminiu JJAM, Benninga MA (2009). Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 49(3):304-308.
- Korkes F, Kumagai FU, Belfort RN, Szejnfeld D, Abud TG, Kleinman A, Florez GM, Szejnfeld T, Chieffi PP (2009). Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in an urban slum. J Trop Pediatr, 55(1): 42-45.
- Kosek M, Bern C, Guerrant RL (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ, 81:197-204.
- Krishnan S & Cooper JA (2014). Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans. European Journal of Nutrition 53(3):691-710. DOI: 10.1007/s00394-013-0638-z.
- Kulda J & Nohynkova E (1996). *Giardia* in humans and animals. In Kreier, J. P. Parasitic protozoa. 2nd ed., vol. 10. Academic Press, Inc., San Diego, Calif, 225–422.
- Kwong JC, Campitelli MA, Rosella LC (2011). Obesity and respiratory hospitalizations during influenza seasons in Ontario, Canada: a cohort study. Clin Infect Dis, 53: 413–421.
- Laishram S, Kannan A, Rajendran P, Kang G, Ajjampur SS (2012). Mixed *Giardia duodenalis* assemblage infections in children and adults in South India. Epidemiol Infect, 140:2023-7.
- Lambl W (1859). Mikroskopische untersuchungen der Darmexcrete. Vierteljahrsschr. Prakst. Heikunde, 61:1–58.

- Lane S & Lloyd D (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*, 28:123–147.
- Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS, Gillin FD (2007). Encystation of *G. lamblia*: A model for other parasites. *Curr Opin Microbiol*, 10(6):554-559.
- Lazo M, Clark JM (2008). The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis*, 28(4):339–350.
- Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2014). Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:908539. DOI: 10.1155/2014/908539.
- Lee HY, Kim J, Noh HJ, Kim HP & Park SJ (2014). *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38, and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunol*, 36: 627–646.
- Leitch GJ, et al (1989) Dietary fiber and giardiasis: dietary fiber reduces rate of intestinal infection by *Giardia lamblia* in the gerbil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41:512–520.
- Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E (2000). Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr*, (71):807–15.
- Levy DA (2004). Parasites and Allergy: From IgE to Th1/Th2 and Beyond. *Clin Rev Allergy Immunol*, 26: 1-4.
- Li E, Zhou P, Petrin Z, Singer S (2004). Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 72: 6642–6649.
- Li E, Zhao A, Shea-Donohue T, Singer SM (2007). Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. *Infect Immun*, 75:4514– 4518.
- Li X, Lu J, Wang Y, Huo X, Li Z, Zhang S, Li C, Guo M, Du X, Chen Z (2016). Establishment and Characterization of a Newly Established Diabetic Gerbil Line. *PLoS One* 11(7):e0159420. doi: 10.1371/journal.pone.0159420.

Liu J, Kabir F, Manneh J, Lertsethtakarn P, Begum S, Gratz J, Becker SM, Operario DJ, Taniuchi M, et al (2014) Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. *Lancet Infect Dis*, 14:716-24.

Liu XY, Xu DL, Wang DH (2012). High body weight associated with impaired nonshivering thermogenesis but improved glucose tolerance in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Thermal Biology* 37(7):524–530. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2012.06.005.

Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velazquez C (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunol* 37:394–406. DOI:10.1111/pim.12210

Lujan HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE (1996). Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 7628-7633.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation* 117:175–184. DOI: 10.1172/JCI29881.

Lumeng CN, Saltiel AR. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 121:2111–2117. DOI: 10.1172/JCI57132. Long KZ, Rosado JL, Santos JJ, et al (2010). Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infect Immun*, 78: 1221–1228.

Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H (2006). Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*, 45(4): 600–606.

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

Madsen AN, Hansen G, Paulsen SJ, Lykkegaard K, Tang-Christensen M, Hansen HS, Levin BE, Larsen PJ, Knudsen LB, Fosgerau K, Vrang N (2010). Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. *Journal of Endocrinology* 206:287–96.

- Maia-Brigagão C, Morgado-Díaz JA, De Souza W (2012). *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitology International*, 61(2):280-287.
- Maloney J, Keselman A, Li E & Singer SM (2015). Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. *Microbes Infect*, 6: 462–467.
- Mancuso P, Gottschalk A, Phare SM, Peters-Golden M, Lukacs NW, Huffnagle GB (2002). Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol*, 168: 4018–4024.
- Mancuso P (2010). Obesity and lung inflammation. *J Appl Physiol*, 108: 722–728.
- Mannino DM et al (2006). Boys with high body masses have an increased risk of developing asthma: findings from the National Longitudinal Survey of Youth (NLSY). *Int J Obesity (Lond)*, 30:6–13.
- Marie NG, Fleming T, Robinson M et al (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 384(9945): 766 – 781.
- Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez A. 2004. Genetics of obesity. *Rev Nutr* 17(3):327-38.
- Martinez-Gordillo MN, González- Maciel A, Reynoso-Robles R., Montijo-Barrios E & Ponce- Macotella M (2014). Intraepithelial *Giardia Intestinalis*: A Case Report and Literature Review. *Medicine.*, 93:1–5.
- Marti A, Marcos A, Martinez JA (2001). Obesity and immune function relationships. *Obes Rev*, 2(2):131-40.
- Mastronicola D, Giuffre A, Testa F, Mura A, Forte E, Bordi E, Pucillo LP, Fiori PL, Sarti P (2011). *Giardia intestinalis* Escapes Oxidative Stress by Colonizing the Small Intestine: A Molecular Hypothesis. *Life*, 63(1):21–25.
- Mathis D (2013). Immunological goings-on in visceral adipose tissue. *Cell Metabolism*, 17:851–9. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.05.008.

- Matsushita M, Yoneshiro T, Aita S, Kameya T, Sugie H, Saito M (2014). Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes*;38(6):812-7. DOI: 10.1038/ijo.2013.206.
- Matos SMA, Assis AMO, Prado MS, Strina A, Santos LA, Jesus SR, Barreto ML (2008). *Giardia duodenalis* infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. *Cad Saúde Pública*, 24(7):1527-1535.
- Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V & Kemonia H (2009). IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochem Cytobiol*, 47: 93–97.
- Matowicka-Karna J, Kralisz M & 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.
- McDade TW, Georgiev AV, Kuzawa CW (2016). Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2016(1):1-16. DOI:10.1093/emph/eov033.
- 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.
- Merluzzi S, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C & Pucillo C (2010). Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood*, 115: 2810–2817.
- Michaud EJ, Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML, Wilkinson JE, Zemel MB, Wilkison WO, Woychik RP (1997). Role of the agouti gene in obesity. *Journal of Endocrinology* 155(2):207-9.
- Miele L, Valenza V, La Torre G, et al (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 49: 1877–87.
- Mohammed SR & Faubert GM (1995). Purification of a fraction of *Giardia lamblia* trophozoite extract associated with disaccharidase deficiencies in immune Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Parasite*, 2:31–39.

- Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K (2003) Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology*. 19:305–311.
- 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.
- Moulin CM, Marguti I, Peron JPS, Rizzo LV, Halpern A (2009). Impact of adiposity on immunological parameters. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 53(2):183-189.
- Moussavi N, Gavino V, Receveur O (2008). Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity (Silver Spring)*, 16(1):7-15. doi: 10.1038/oby.2007.14.
- Muhsen K & Levine MM (2012). A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin Infect Dis*, 55 (Suppl 4):S271-93.
- Musso G, Gambino R, Cassader M (2009). Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*, 48(1):1–26.
- Myers Jr MG, Leibel RL, Seeley RJ & Schwartz MW. 2010. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21:643–651. DOI: 10.1016/j.tem.2010.08.002.
- Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS et al (2012). Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J Infect Dis*, 205:830–40.
- Nakajima V, Kobayasi S, Naresse LE, Leite CVS, Curi PR, Montovani JC (2008). Alterations in the intestinal wall due to protein malnutrition in rats: evaluation of the rupture strength and the tissue's collagen. *Acta Cir Bras* 23(5):435-440.
- Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Cicogna AC (2008). A Hypercaloric Pellet-Diet Cycle Induces Obesity and Co-Morbidities in Wistar Rats. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52(6):968-974.
- Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*, 156:974-84.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet* 387(10026): 1377 – 1396. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X).

Nelson DP & Kiesow LA (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). *Anal Bioch*, 49:474-478.

Newman RD, Moore SR, Lima AAM, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL (2001). A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Tropical Medicine and International Health*, 6(8): 624-634.

Niehaus MD, Moore SR, Patrick PD, Derr LL, Lorntz B, Lima AA, Guerrant RL (2002). Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg*, 66(5): 590-593.

Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL et al. (1999). Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc* 99, 294–299.

Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacologica Sinica* 33:173-81. DOI: 10.1038/aps.2011.203.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Samadi J, Wolff SP (1994). Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation – xylenol Orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Bioch*, 220:403-409.

Nkrumah B & Nguah SB (2011). *Giardia lamblia*: a major parasitic cause of childhood diarrhoea in patients attending a district hospital in Ghana. *Parasites & Vectors* 4(163).

Obendorf J, Renner Viveros P, Fehlings M, Klotz C, Aebischer T & Ignatius R (2013). Increased expression of CD25, CD83, and CD86, and secretion of IL-12, IL-23, and IL-10 by human dendritic cells incubated in the presence of Toll-like receptor 2 ligands and *Giardia duodenalis*. *Parasit Vectors*, 6: 317.

Oberhuber G & Stolte M (1990). Giardiasis: analysis of histological changes in biopsy specimens of 80 patients. *J Clin Pathol*, 43:641-643.

- Oberhuber G, Kastner N, Stolte M (1997). Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol*, 32:48-51.
- O'Hara JR & Buret AG (2008). Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front Biosci*, 13: 7008–7021.
- O'Loughlin EV, Pang GP, Noltorp R, Koina C, Batey R, Clancy R (2001). Interleukin 2 modulates ion secretion and cell proliferation in cultured human small intestinal enterocytes. *Gut*, 49:636–643.
- Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, et al (2008). DEFI Study Group: Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis*, 15:1547-54.
- Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E et al (2008). Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *J Leukoc Biol*, 83: 1502– 1511.
- Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, Yilmaz MI, Sayal A, Isimer A, Ozdemir IC (2002). Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem*, 35: 627–631.
- Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiacka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder F, Svard S (2005). Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, 141:199-207.
- Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V, Mitolo CI, Acquafredda A, Brandonisio O, Cavallo P (2007). Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51: 302–309.
- Panchal SK & Brown L (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:351982. DOI: 10.1155/2011/351982.
- Park S, Rich J, Hanses F, Lee JC (2009). Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Leprdb/Leprdb mice to infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 77: 1008–1014.
- Paz-filho GJ, Volaco A, Suplicy HL, Radominski RB & Boguszewski CL. 2009. Decrease in leptin production by the adipose tissue in obesity associated with severe metabolic syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 53(9):1088-1095. DOI: 10.1590/S0004-27302009000900005.



- Paz-Filho GJ, Mastronardi C, Franco CB, Wang KB, Wong ML, Licinio J. 2012. Leptin: Molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 56:597–607.
- Perdichizzi G , Bottari M , Pallio S , Fera MT , Carbone M , Barresi G (1996). Gastric infection by *Helicobacter pylori* and antral gastritis in hyperglycemic obese and in diabetic subjects. *The new Microbiologica*, 19(2):149-154.
- Pereira MG, Atwill ER, Barbosa AP (2007). Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 49(3): 139-145.
- Pestechian N, Rasekh H, Rostami-Nejad M, Yousofi HA, Hosseini-Safa A (2014). Molecular identification of *Giardia lamblia*; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 7:168-72.
- Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nature Genetics* 13: 18–9.
- Pihl E, Zilmer K, Kullisaar T, Kairane C, Magi A, Zilmer M (2006). Atherogenic inflammatory and oxidative stress markers in relation to overweight values in male former athletes. *Int J Obesity*. 30:141–146.
- Pires ALG, Silveira TR, Silva VD (2003). Estudo morfométrico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarréia persistente. *J Pediatr Rio J*, 79(4): 329-336.
- Piva B & Benchimol M (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell*, 96:735-746.
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi, G. 2012. Nonalcoholic fatty liver disease: Multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 46:272–284. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31824587e0.
- Popkin BM, Adair LS, Ng SW (2012). NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutrition Reviews*;70(1):3-21. DOI:10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x.

- Postic C & Girard J (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, 118(3):829–838.
- Potapov EV, Loebe M, Anker S et al (2003). Impact of body mass index on outcome in patients after coronary artery bypass grafting with and without valve surgery. *Eur Heart J*, 24: 1933–1941.
- Puebla LJ, Núñez FA, Fernández YA, Fraga J, Rivero LR, Millán IA, Valdés-Silva IM (2014). Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Cuban children. *Infect Genet Evol*, 23:7-12.
- Quigley EMM, Stanton C, Murphy EF (2013). The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. *Journal of Hepatology*, 58:1020-1027. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.023.
- Reeves GM, Mazaheri S, Snitker S, Langenberg P, Giegling I, Hartmann AM, et al (2013). A positive association between *T. gondii* seropositivity and obesity. *Front. Public Health* 1:73 (1-6). doi:10.3389/fpubh.2013.00073
- Reinecker HC & Podolsky DK (1995). Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 92:8353–7.
- Reynoso-Robles R, Ponce-Macotela M, Rosas-López LE, Ramos-Morales A, Martínez-Gordillo MN, González-Maciél A (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Sci Rep*, 16;5:15168. DOI: 10.1038/srep15168.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2: 361–367.
- Ringqvist E, Palm JE, Skarin H, et al (2008). Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol*, 159: 85–91.
- Robert V, Bourgoquin C, Depoix D, Thouvenot C, Lombard N, Grellier P (2008). Malaria and obesity: obese mice are resistant to cerebral malária. *Malaria Journal*, 7:81. doi:10.1186/1475-2875-7-81.

- Roden M. 2006. Mechanisms of disease: Hepatic steatosis in type 2 diabetes—Pathogenesis and clinical relevance. *Nature Reviews Endocrinology* 2:335–348. DOI:10.1038/ncpendmet0190.
- Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS (2013). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(1):9-22. Doi: 10.1038/nri3341.
- Rosini TC, da Silva ASR, Moraes C (2012). Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 58(3):383-387. DOI: 10.1590/S0104-42302012000300021.
- Roskens H & Erlandsen SL (2002). Inhibition of in vitro attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. *J Parasitol* 88:869–873.
- Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG (2006). *Giardia* immunity – an update. *TRENDS in Parasitology*, 22(1): 26-31.
- Saha TK & Ghosh TK (1977). Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology*, 72:402–405.
- Saki J, Khademvatan S, Maraghi S, Soltani S (2011). Serum lipid profiles and eosinophilia among *Giardia* cyst passers. *African Journal of Microbiology Research*, 5(27):4881-4884.
- Sánchez F, García R, Alarcón F, Cruz M (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Méd Méx*, 141:505–512.
- 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.
- Sarnáglia GD, Covre LP, Pereira FEL, Guedes HLM, Faria AMC, Dietze R, Rodrigues RR, Maioli TU, Gomes DCO (2016). Diet-induced obesity promotes systemic inflammation and increased susceptibility to murine visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 143:12.
- Sato-Mito N, Suzui M, Yoshino H, Kaburagi T, Sato K (2009). Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. *Journal of Nutrition Health & Aging* 13: 602–6.

- Savioli L, Smith H, Thompson A (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*, 22: 203–208.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D & Rose-John S (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin- 6. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 878–888.
- Scott KG, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA, Buret AG (2000). Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia* muris-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun*, 68:3412–3418.
- Scott KG, 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 KG, Yu LC, Buret AG (2004). Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*, 72: 3536–3542.
- Semiane N, Foufelle F, Ferré P, Hainault I, Ameddah S, Mallek A, Khalkhal A, Dahmani Y (2016). High carbohydrate diet induces nonalcoholic steato-hepatitis (NASH) in a desert gerbil. *Comptes Rendus Biologies*, S1631-0691(16)30125-1. DOI: 10.1016/j.crv.2016.09.002.
- Shanab AA, Scully P, Crosbie O, et al (2011). Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with Toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci*, 56:1524–34.
- Shelton AA (2004). Sexually Transmitted Parasitic Diseases. *Clinics in colon and rectal surgery*, 17: 231-234.
- Shukla G, Sidhu RK & Verma A (2012). Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102: 61–72.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82(2): 291-295.
- Simmonds M, Llewellyn A, Owen CG, Woolacott N (2016). Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 17(2):95-107. DOI: 10.1111/obr.12334.

- Simon CE (1922). A critique of the supposed rodent origin of human giardiasis. *Am J Hyg*, 2: 406–434.
- Simsek Z, Yildiz FZ, Kurcer MA (2004). Effect of *Giardia* Infection on Growth and Psychomotor Development of Children Aged 0–5 Years. *J Trop Pediatr*, 50(2): 90-93.
- Singer SM & Nash TE (2000). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 68: 170–175.
- Siwila J, Phiri IG, Enemark HL, Nchito M, Olsen A (2010). Intestinal helminths and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg*, 104:122–128.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*, 30:1379– 1393.
- Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA (2007). Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J Nutr*, 137: 1236–1243.
- Smith AG, Sheridan PA, Tseng RJ, Sheridan JF, Beck MA (2009). Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. *Immunol*, 126: 268–279.
- Solari AJ, Rahn MI, Saura A, Lujan 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 & Singer SM (2010). Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J Immunol*, 187 (7): 3769-3775.
- Sotto A & Gra B (1985). Hepatic manifestations in giardiasis. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 15(2):89-94.
- Sotto A1, Alvarez JL, García B, Pomar F, Cendán A (1990). Acute hepatic lesion caused by *Giardia lamblia*. *Rev Esp Enferm Dig*, 77(1):24-8.

- St-Pierre J & Tremblay ML. 2012. Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases. *Cell Metabolism* 15(3):292-7. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.02.004.
- 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:e45325.
- 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 Microbiol*, 13:256.
- Stiles CW (1902). The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. *Zool Anz*, 25:689.
- Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffé-Scrive M (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*; 44:645–51.
- Suzuki T, Hara H (2010). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in leto and oletf rats. *Nutr Metab*, 12;7:19. DOI: 10.1186/1743-7075-7-19.
- Syed A, Hill DR (2003). *Giardia intestinalis*. *Gastrointestinal Infections*, 1(16):453-460.
- Tako EA, Hassimi MF, Li E, Singer SM (2013). Transcriptomic analysis of the host response to *Giardia duodenalis* infection reveals redundant mechanisms for parasite control. *MBio*, 4: e00660-13.
- Tarantino G, Savastano S, Colao A. 2010. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World Journal of. Gastroenterology* 16:4773–4783. DOI: 10.3748/wjg.v16.i38.4773.
- Tandon BN, Tandon RK, Satpathy BK (1977). Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut*, 18(3): 176-181.
- 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.

Teixeira L, Moreira J, Melo J, Bezerra F, Marques RM, Ferreirinha P, Correia A, Monteiro MP, Ferreira PG, Vilanova M (2015). Immune response in the adipose tissue of lean mice infected with the protozoan parasite *Neospora caninum*. *Immunology*, 145(2):242-257. doi:10.1111/imm.12440.

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

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

Thompson RC & Monis P (2012). *Giardia*-from genome to proteome. *Adv Parasitol*;78:57-95. DOI: 10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7.

Tilg H & Moschen AR (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):772-83.

Tilg H & Moschen AR. 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52:1836–1846. DOI: 10.1002/hep.24001.

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

Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS & Fried SK. 2004. Interleukin-6 Regulates Human Adipose Tissue Lipid Metabolism and Leptin Production in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(11): 5577-82. DOI:10.1210/jc.2004-0603.

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

Ustun S, Turgay N, Delibas SB, Ertabaklar H (2004). Interleukin (IL) 5 levels and eosinophilia in patients with intestinal parasitic diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10(24):3643-3646.

- van Stijn CM, Kim J, Lusic AJ, Barish GD, Tangirala RK. 2015. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *The FASEB Journal* 29(2):636-49. DOI:10.1096/fj.14-253831.
- Velazquez C, Beltran M, Ontiveros N, et al (2005). *Giardia lamblia* infection induces diferente 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, Oliveira DR, Viana JC, Santos JFG, Caliari MV, Gomes MA. 2013. Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* 133:391-395. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.01.007.
- Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz JC, Smok G, Thielemann L, Poniachik J. 2004. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science* 106(3):261-268. DOI: 10.1042/CS20030285.
- Vincent AL, Rodrick GE, Sodeman WA Jr. (1979). The Pathology of the Mongolian Gerbil (*Meriones Unguiculatus*): A Review. *Lab Animal Science* 29 (5): 645-651.
- Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MR (2006). Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras*, 21: 6. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>.
- Walker RI & Owen RL (1990) Intestinal barriers to bacteria and their toxins. *Annual Review of Medicine* 41:393–400.
- Wang Y, Li J, Tang L, Charnigo R, de Villiers W, Eckhardt E (2010). T-lymphocyte responses to intestinally absorbed antigens can contribute to adipose tissue inflammation and glucose intolerance during high fat feeding. *PLoS One*, 11;5(11):e13951. DOI: 10.1371/journal.pone.0013951.
- Ward HD (2009). Intestinal protozoal parasites and diarrheal disease in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.*, 48:1198–1200.



- Weber DJ, Rutala WA, Samsa GP, Santimaw JE, Lemon SM (1985). Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. *JAMA*, 254(22):3187-9.
- Wellen KE & Hotamisligil GS (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115:1111–1119.
- West DB, Waguespack J, McCollister S (1995). Dietary obesity in the mouse: interaction of strain with diet composition. *American Journal of Physiology* 268:R658–R665.
- White BD & Martin RJ (1997). Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 214: 222-32.
- Wieland CW, Florquin S, Chan ED et al (2005). Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient ob/ob mice. *Int Immunol*, 17: 1399–1408.
- Wiest R & Ralth HC (2003). Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(3):397-425.
- Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*,140(1):124–131.
- Williamson AL, O'Donoghue PJ, Upcroft JA, Upcroft P (2000). Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int. J. Parasitol.*, 30:129–136.
- Winterbourn CC (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*, 4(5):278-86. DOI: 10.1038/nchembio.85.
- Witthoft T, Eckmann L, Kim JM, Kagnoff MF (1998). Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am J Physiol*. 75:G564-G571.
- Woessner DJ & Dawson SC (2012). The *Giardia* Median Body Protein Is a Ventral Disc Protein That Is Critical for Maintaining a Domed Disc Conformation during Attachment. *Eukaryotic Cell*, 11(3): 292-301.
- Wolfe MS (1992). Giardiasis. *Clin Microbiol. Rev*; 5(1): 93-100.

World Health Organization (2016). Obesity and overweight, Fact sheet N°311, updated June 2016. Acessado em outubro de 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. 2003. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 112:91–100. DOI: 10.1172/JCI17797.

Xu DL, Liu XY, Wang DH (2011). Impairment of cellular and humoral immunity in overweight Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Integrative Zoology* 6:353–366. DOI: 10.1111/j.1749-4877.2011.00259.x

Yamada T (2008). In search of new ideas for global health. *N Engl J Med.*, 358:1324-1325.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8:1288–1295. DOI: 10.1038/nm788.

Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, Dixit VD (2009). Obesity accelerates thymic aging. *Blood*, 114(18):3803-12. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213595.

Yang Z, Grinchuk V, Smith A, Qin B, Bohl JA, Sun R, Notari L, Zhang Z, Sesaki H, Urban JF Jr, Shea-Donohue T, Zhao A (2013). Parasitic nematode-induced modulation of body weight and associated metabolic dysfunction in mouse models of obesity. *Infect Immun*, 81(6):1905-14.

Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol*; 3:27-43.

Ylöstalo P, Suominen-Taipale L, Reunanen A, Knuutila M (2008). Association between body weight and periodontal infection. *J Clin Periodontol*, 35: 297-304.

Zalipaeva TL. Clinical symptoms of giardia infection in children (2002). *Med Parazitol* 2002; 3: 29-32.

Zavala GA, García OP, Campos-Ponce M, Ronquillo D, Caamaño MC, Doak CM, and Rosado JL. 2015. Children with moderate-high infection with *Entamoeba coli* have higher percentage of body and abdominal fat than non-infected children. *Pediatric Obesity*, doi: 10.1111/ijpo.12085.

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

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425–432.

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

*Anexos*

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A:</b> Certificado de aprovação deste trabalho pelo CEUA-UFMG	ii
<b>Anexo B:</b> Valores absolutos dos resultados de peso na 10 <sup>a</sup> semana, peso final, peso relativo do tecido adiposo e peso relativo do fígado dos gerbils, no decorrer do período experimental.	iii
<b>Anexo C:</b> Valores absolutos dos resultados das dosagens de Colesterol Total, Triglicerídeos, Proteínas totais, Albumina e Glicose nos grupos, no final do experimento.	iv
<b>Anexo D:</b> Valores absolutos dos resultados das dosagens de de Superóxido dismutase (SOD), Catalase e Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e no intestino delgado dos grupos, no final do experimento.	v
<b>Anexo E:</b> Valores absolutos dos resultados das dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IFN- $\gamma$ no intestino delgado dos grupos, no final do experimento.	vi
<b>Anexo F:</b> Valores absolutos dos resultados de Adiponectina, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e Leptina no tecido adiposo epididimal dos grupos, no final do experimento.	vii



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS  
GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE  
ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 136 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Giardíase e Estado Nutricional: aspectos da doença em animais experimentalmente obesos”, que tem como responsável DIRCE RIBEIRO DE OLIVEIRA, 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 02/12/2014. Este certificado espira-se em 02/12/2019.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 136 / 2013, related to the Project entitled “Giardiasis and Nutritional Status: aspects of the disease in experimentally obese animals”, under the supervision of DIRCE RIBEIRO DE OLIVEIRA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 02/12/2014. This certificate expires in 02/12/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 02/12/2014.

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](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Valores absolutos dos resultados de peso na 10<sup>a</sup> semana, peso final, peso relativo do tecido adiposo e peso relativo do fígado dos gerbils dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no decorrer do período experimental.

*PARÂMETROS*

<i>GRUPOS</i>	<b>Peso na 10<sup>a</sup> semana (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Peso relativo do tecido adiposo (%)</b>	<b>Peso relativo do fígado (%)</b>
<i>CT</i>	73,14 ± 3,10 <sup>a</sup>	70,29 ± 2,74 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,24 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,18 <sup>a,b</sup>
<i>CTIN</i>	77 ± 4,55 <sup>a</sup>	73,0 ± 4,66 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,49 <sup>a</sup>	3,93 ± 0,11 <sup>a,d</sup>
<i>XCTIN</i>	74,86 ± 3,54 <sup>a</sup>	72,14 ± 2,87 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,47 <sup>a</sup>	2,94 ± 0,06 <sup>b</sup>
<i>OB</i>	110 ± 2,34 <sup>b</sup>	111,9 ± 2,32 <sup>b</sup>	8,09 ± 0,35 <sup>b</sup>	4,77 ± 0,22 <sup>c</sup>
<i>OBIN</i>	106 ± 2,92 <sup>b</sup>	103,9 ± 2,01 <sup>b,c</sup>	7,86 ± 0,41 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,29 <sup>a,e</sup>
<i>XOBIN</i>	104,6 ± 7,53 <sup>b</sup>	94,59 ± 5,08 <sup>c</sup>	5,30 ± 0,63 <sup>c</sup>	4,36 ± 0,28 <sup>c,d,e</sup>

Dados expressos em média ± erro padrão. n= 7.

Valores absolutos dos resultados das dosagens de Colesterol Total, Triglicerídeos, Proteínas totais, Albumina e Glicose nos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento.

## PARÂMETROS

<i>GRUPOS</i>	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Proteínas Totais (mg/dL)	Albumina (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
<i>CT</i>	82,75 ± 2,90 <sup>a</sup> p<0,001	180,2 ± 14,49 <sup>a,b</sup>	6,42 ± 0,14 <sup>a,b</sup>	2,17 ± 0,04	133,5 ± 3,26
<i>CTIN</i>	76,61 ± 3,36 <sup>a</sup> p<0,001	152,9 ± 4,44 <sup>b</sup>	6,07 ± 0,17 <sup>a</sup> p<0,01	2,13 ± 0,03	144,1 ± 10,75
<i>XCTIN</i>	82,09 ± 4,62 <sup>a</sup> p<0,01	176,6 ± 20,60 <sup>a,b</sup>	6,30 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	2,21 ± 0,05	146,6 ± 8,89
<i>OB</i>	89,08 ± 3,44 <sup>a</sup> p<0,01	250,7 ± 15,37 <sup>c</sup>	7,45 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,24 ± 0,05	182,0 ± 14,17
<i>OBIN</i>	114,5 ± 8,49 <sup>b</sup>	222,3 ± 10,18 <sup>a,c</sup>	6,15 ± 0,22 <sup>a</sup> p<0,05	2,27 ± 0,11	170,4 ± 25,57
<i>XOBIN</i>	94,39 ± 6,58 <sup>a</sup> p<0,05	240 ± 22,78 <sup>c</sup>	6,07 ± 0,12 <sup>a</sup> p<0,01	2,43 ± 0,12	153,5 ± 8,29

Dados expressos em média ± erro padrão. n= 7.



## ANEXO D

Valores absolutos dos resultados das dosagens de Superóxido dismutase (SOD), Catalase e Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento.

### PARÂMETROS

GRUPOS	SOD no	Catalase no	TBARS no	SOD no	Catalase no	TBARS no
	Fígado (U/gPTN)	Fígado (U/gPTN)	Fígado ([MDA]/gPTN)	Intestino Delgado (U/gPTN)	Intestino Delgado (U/gPTN)	Intestino Delgado ([MDA]/gPTN)
CT	1,74±0,75	6,76±0,40	0,52 ± 0,06	1,25±0,10	1,57±0,12	0,30±0,03
CTIN	1,17 ± 0,0 <sup>A</sup>	4,35±0,42	0,39 ± 0,03	0,98±0,06	3,14±0,64	0,52±0,05 <sup>\$</sup>
XCTIN	1,68 ± 0,12 <sup>B</sup>	4,69±0,23	0,61 ± 0,09	1,2±0,05	3,29±0,74	0,39±0,03
OB	1,40±0,11	4,65±0,40	0,72 ± 0,30	1,42±0,10	4,35±0,95 <sup>#</sup>	0,34±0,05
OBIN	1,54±0,08	3,61±0,25 <sup>D</sup>	0,35 ± 0,06	1,42±0,04*	2,07±0,59	0,41±0,04
XOBIN	1,22 ± 0,10 <sup>C</sup>	3,15±0,24 <sup>E</sup>	0,60 ± 0,11	1,28±0,17	2,88±0,52	0,42±0,06

Dados expressos em média ± erro padrão. n= 6-7.

- <sup>A</sup> p<0,01 em relação a CT
- <sup>B</sup> p<0,05 em relação a CTIN
- <sup>C</sup> p<0,05 em relação a CT
- <sup>D</sup> p<0,01 em relação a CT
- <sup>E</sup> p<0,001 em relação a CT
- \* p<0,05 em relação a CTIN
- <sup>#</sup> p<0,05 em relação a CT
- <sup>\$</sup> p<0,05 em relação a CT

## ANEXO E

Valores absolutos dos resultados das dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IFN- $\gamma$  no intestino delgado dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento.

### CITOCINAS

	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
<b>CT</b>	3,41 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	32,97 $\pm$ 3,52 <sup>a</sup>	42,22 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>	11,42 $\pm$ 4,92 <sup>a</sup>	113,1 $\pm$ 23,93 <sup>a,b</sup>	40,9 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>
<b>CTIN</b>	18,4 $\pm$ 4,99 <sup>b,c</sup>	23,95 $\pm$ 2,26 <sup>a,b</sup>	139,6 $\pm$ 15,0 <sup>b</sup>	60,42 $\pm$ 9,58 <sup>b,c</sup>	162,9 $\pm$ 30,44 <sup>a</sup>	39,41 $\pm$ 2,01 <sup>a,b</sup>
<b>XCTIN</b>	85 $\pm$ 9,48 <sup>a,b</sup>	24,53 $\pm$ 3,12 <sup>a,b</sup>	184,8 $\pm$ 49,41 <sup>b</sup>	63,07 $\pm$ 8,99 <sup>b,c</sup>	160,3 $\pm$ 29,01 <sup>a</sup>	38,47 $\pm$ 1,86 <sup>a,b</sup>
<b>OB</b>	4,858 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	21,21 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>	51,86 $\pm$ 16,73 <sup>a,b</sup>	36,67 $\pm$ 5,51 <sup>a,b</sup>	94,47 $\pm$ 18,63 <sup>a,b</sup>	34,76 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>
<b>OBIN</b>	65,94 $\pm$ 5,78 <sup>c</sup>	30,91 $\pm$ 2,33 <sup>a,b</sup>	87,09 $\pm$ 14,77 <sup>a,b</sup>	79,93 $\pm$ 3,72 <sup>c</sup>	120,5 $\pm$ 14,23 <sup>a,b</sup>	34,85 $\pm$ 0,95 <sup>a,b</sup>
<b>XOBIN</b>	70,64 $\pm$ 10,62 <sup>a,b</sup>	24,27 $\pm$ 2,09 <sup>a,b</sup>	85,56 $\pm$ 13,14 <sup>a,b</sup>	51,35 $\pm$ 6,31 <sup>b,c</sup>	64,33 $\pm$ 3,31 <sup>b</sup>	38,89 $\pm$ 1,45 <sup>a,b</sup>

Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 6-7.

Valores absolutos dos resultados de Adiponectina, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e Leptina no tecido adiposo epididimal dos grupos Controle (CT), Controle Infectado por uma semana (CTIN), Controle Infectado por 2 semanas (XCTIN), Obeso (OB), Obeso Infectado por uma semana (OBIN) e Obeso Infectado por 2 semanas (XOBIN), no final do experimento.

## CITOCINAS

	Adiponectina (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	Leptina (pg/mL)
<i>CT</i>	324,1 $\pm$ 19,06 <sup>a</sup>	173,8 $\pm$ 18,28 <sup>a</sup>	123,9 $\pm$ 11,08 <sup>a</sup>	72,66 $\pm$ 5,03	69,99 $\pm$ 6,21
<i>CTIN</i>	230,2 $\pm$ 71,36 <sup>a,c</sup>	336,6 $\pm$ 37,93 <sup>b,c</sup>	70,2 $\pm$ 6,22 <sup>b,c,d</sup>	60,34 $\pm$ 6,01	65,48 $\pm$ 3,61
<i>XCTIN</i>	162,9 $\pm$ 40,53 <sup>a,b</sup>	290,5 $\pm$ 37,09 <sup>a,b,c</sup>	77,86 $\pm$ 4,40 <sup>a,c,d</sup>	62,16 $\pm$ 9,08	62,87 $\pm$ 4,07
<i>OB</i>	23,25 $\pm$ 8,75 <sup>b</sup>	344,8 $\pm$ 46,56 <sup>b,c</sup>	63,11 $\pm$ 6,52 <sup>b,c,d</sup>	63,17 $\pm$ 7,89	62,97 $\pm$ 4,91
<i>OBIN</i>	59,22 $\pm$ 15,6 <sup>b,c</sup>	198,4 $\pm$ 38,1 <sup>a</sup>	95,45 $\pm$ 7,53 <sup>a,c</sup>	160,1 $\pm$ 37,57	62,23 $\pm$ 5,55
<i>XOBIN</i>	33,8 $\pm$ 11,83 <sup>b,c</sup>	182,4 $\pm$ 23,35 <sup>a</sup>	53,44 $\pm$ 8,04 <sup>b,d</sup>	79,77 $\pm$ 13,50	73,48 $\pm$ 8,31

Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. n= 6-7.

**Para adiponectina:**

CT vs OB p<0,001  
CT vs OBIN p<0,05  
CT vs XOBIN p<0,01  
OB vs CTIN p<0,05

**Para TNF- $\alpha$ :**

CT vs CTIN p<0,05  
CT vs OB p<0,05  
CTIN vs OBIN p<0,05  
OB vs CTIN p<0,05  
CTIN vs XOBIN p<0,05  
OB vs XOBIN p<0,05

**Para IL-10:**

CT vs CTIN p<0,05  
CT vs OB p<0,01  
CT vs XOBIN p<0,001  
OB vs CTIN p<0,05  
OBIN vs XOBIN p<0,05

“Que diremos, pois, à vista destas coisas? Se Deus é por nós, quem será contra nós? Aquele que não poupou o seu próprio Filho, antes, por todos nós o entregou, porventura, não nos dará graciosamente com ele, todas as coisas?”.

Romanos 8:31,32