

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

Impacto da desnutrição sobre o metabolismo e o desenvolvimento de alterações histopatológicas no intestino delgado de Gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados com *Giardia lamblia*.

Luciana Laranjo Amorim Ventura

Belo Horizonte – MG

2012

Luciana Laranjo Amorim Ventura

Impacto da desnutrição sobre o metabolismo e o desenvolvimento de alterações histopatológicas no intestino delgado de Gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados com *Giardia lamblia*.

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

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Maria Aparecida Gomes

Coorientação: Dirce R Oliveira

Marcelo V Caliar

Belo Horizonte – MG

2012

*“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”.*

1 Coríntios 13:2

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

*A Deus*

*porque Dele, por Ele e para ele são todas as coisas.*

*Ao Fernando,*

*pelo amor e carinho sempre presentes,*

*E aos meus pais,*

*que me ensinaram que os estudos são a base para qualquer futuro.*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

*Há tantos a quem agradecer...*

*Acima de tudo, a **Deus**, pois se até aqui cheguei, foi por intermédio Dele, exclusivamente.*

*Muito especialmente aos meus queridos **Cidinha** e **Fabiano**, pelo carinho, atenção, prestatividade e acima de tudo, por me abrirem as portas e acreditarem em mim, me dando a oportunidade de alcançar meus planos. Vocês não imaginam o quanto sou agradecida!*

*À querida **Dirce**, colaboradora, incentivadora, amiga, conselheira, por toda atenção e todo tempo dedicado ao meu crescimento!*

*Ao Professor **Marcelo**, pelo ensinamento e atenção dados prontamente sempre que solicitado!*

*Aos estimados **Joãozinho** e **Edna**, **Carlos** do biotério, **Mirna** do Laboratório de Patologia e **Jamil** da bioquímica, exímios profissionais, sem os quais não seria possível concluir este trabalho!*

*Aos meus queridos colegas de laboratório, especialmente à **Thaísa**, **Joice**, **Nicole**, **Fabrizio** e **Frederico** que me ajudaram em muitas coisas e me ensinaram tantas outras!*

*Aos **amigos** de infância, dos últimos anos, da Nutrição, do dia-a-dia, da família, pelos momentos de diversão e por entender que Mestrado também é trabalho!*

*Especialmente aos meus **padrinhos**, amigos e acima de tudo, irmãos pelos conselhos sábios e amizade incondicional!*

*E por mais absurdo que alguns possam achar, agradeço aos meus **cãopanheiros**, pelos rabinhos vibrantes de carinho e devoção, que sempre deixaram meus dias mais alegres!*

*A minha eterna "**Turma do Pepino**", que tornou esta caminhada muito mais agradável, divertida e cheia de boas lembranças!*

*Aos demais **professores** do Departamento de Parasitologia, pela excelência no ensino, especialmente ao professor **Alan**, que me ensinou que "Mestre não é quem sempre ensina, mas quem, de repente, aprende".*

*À **Sibele** e à **Sumara** pela paciência e prestatividade!*

*Aos meus amados **pais**, pelo amor, e por me dar todas as condições para chegar até aqui e por nunca, em tempo algum, duvidarem da minha capacidade.*

*Ao **Fernando**, maior presente que eu poderia ter ganhado nesta vida, pelo amor incondicional, paciência, atenção e cuidado que me ajudaram a concluir essa etapa!*

*A **todos vocês**, muito obrigada!*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolução do peso corporal dos animais durante o experimento .....	42
<b>Figura 2.</b> Consumo alimentar dos animais durante o experimento .....	42
<b>Figura 3.</b> Distribuição de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn .....	44
<b>Figura 4.</b> Teor de colesterol nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn .....	44
<b>Figura 5.</b> Distribuição de proteínas nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn .....	45
<b>Figura 6.</b> Teor de proteínas nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn .....	45
<b>Figura 7.</b> Altura de Vilosidade ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos experimentais .....	47
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de intestino delgado de Gerbils controle e inoculados com trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> .....	48
<b>Figura 9.</b> Produção de muco ( $\mu\text{m}^2$ ) pelos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn .....	49
<b>Figura 10.</b> Reação imunohistoquímica para trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Representação esquemática do delineamento experimental.....	31
<b>Tabela 2.</b> Composição das dietas experimentais Controle e Deficiente em Proteína (g/kg). .	31
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros bioquímicos dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn no final do experimento.....	43
<b>Tabela 4.</b> Perfil lipídico hepático e cecal dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn no final do experimento.....	46
<b>Tabela 5.</b> Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo hepático dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CT** – Controle

**CTIn** – Controle Infectado

**DN** – Desnutrido

**DNIn** – Desnutrido Infectado

**SPSS** - *Statistical Package for the Social Sciences*

**CDC** – *Centers for Disease Control*

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**DALYs** – Anos de Vida Ajustados por Invalidez

**ONU** – Organização das Nações Unidas

**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

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

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

**SLU** - Serviço de Limpeza Urbana

**PBS** – Solução Salina Tamponada

**FPLC** - Fast Protein Liquid Chromatography

**VLDL** - Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

**QM** – Quilomicra

**IDL** - Lipoproteínas de Densidade Intermediária

**LDL** - Lipoproteínas de Baixa Densidade

**HDL** - Lipoproteínas de Alta Densidade

**TBARs** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

**SOD** – Superóxido Dismutase

**H&E** - Hematoxilina e Eosina

**PAS** - Ácido Periódico de Schiff

**ANOVA** - Análise de Variância

**ROS** – *Reactive Oxygen Species*

**MDA** – Malonaldeído

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	i
<b>Lista de Tabelas</b> .....	ii
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	iii
<b>Resumo</b> .....	<b>13</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1. Objetivo Geral .....	28
3.2. Objetivos Específicos .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1. Modelo experimental .....	30
4.2. Divisão de grupos e delineamento experimental .....	30
4.3. Composição das dietas .....	31
4.4. Avaliação do ganho de peso corporal e ingestão alimentar .....	32
4.5. Avaliação da desnutrição .....	32
4.6. Cepa de <i>Giardia</i> e condições de cultivo .....	32
4.7. Ajuste do inóculo e infecção experimental .....	33
4.8. Coleta de amostras durante o experimento .....	33
4.9. Necropsia dos animais e coleta de materiais .....	33
4.10. Contagem de trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal .....	34
4.11. Determinação da glicemia .....	34
4.12. Dosagens séricas de proteínas totais e albumina .....	34
4.13. Avaliação do perfil lipídico sérico .....	35
4.13.1. Determinação das concentrações de colesterol total .....	35
4.13.2. Determinação das concentrações de triglicerídeos .....	36
4.13.3. Separação de lipoproteínas e determinação de colesterol, triglicerídeos e proteínas nas frações .....	36
4.14. Determinação de colesterol total e triglicerídeos hepáticos e cecais .....	37
4.15. Avaliação do Estresse Oxidativo .....	37
4.15.1. Dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARs .....	37
4.15.2. Dosagem da atividade da enzima antioxidante Catalase .....	38
4.15.3. Dosagem da atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase .....	38

4.16. Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal .....	38
4.17. Reação imunohistoquímica e análise quantitativa para trofozoítos .....	39
4.18. Análise Estatística .....	40
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
REFERÊNCIAS .....	61

## RESUMO

A giardíase, infecção intestinal ocasionada pela *Giardia lamblia*, é uma importante causa de diarreia e má absorção intestinal. Diversos estudos já avaliaram a influência desta doença no estado nutricional. Contudo, o impacto da giardíase em desnutridos é especulativo, não havendo evidências que caracterizem a desnutrição como fator agravante da doença. Assim, este estudo avaliou os efeitos metabólicos e histopatológicos da infecção por *G. lamblia* em animais previamente desnutridos. Utilizaram-se 32 gerbils, fêmeas, com 4 a 6 semanas, distribuídos em 4 grupos: Controle (CT) e Controle Infectado (CTIn), recebendo dieta com 20% de proteína; Desnutrido (DN) e Desnutrido Infectado (DNIn), com dieta contendo 5% de proteína. No 28º dia de experimento, os animais dos grupos CTIn e DNIn foram infectados com *G. lamblia*, oralmente, permanecendo infectados por 7 dias, quando todos animais foram eutanasiados e coletados sangue, intestino delgado, fígado e conteúdo cecal. Os animais foram pesados semanalmente utilizando-se balança com escala. Para avaliação bioquímica, as dosagens séricas de glicemia, albumina, colesterol e triglicérides foram determinadas por ensaio enzimático, sendo que a de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford. O fracionamento das lipoproteínas séricas foi realizado pelo sistema de *Fast Protein Liquid Chromatography*. A determinação dos lípides hepáticos e cecais 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 foi coletada, fixada e destinada à obtenção de cortes e coloração com Hematoxilina & Eosina, Ácido Periódico de Schiff e para produção de lâminas para imunohistoquímica. A altura das vilosidades, área de muco e área de trofozoítos 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 Tukey para comparação entre os grupos experimentais. Utilizou-se o pacote estatístico SPSS versão 20.0, considerando-se um nível de significância de 5%. Observou-se que os gerbils alimentados com dieta hipoprotéica apresentaram peso corporal significativamente menor, além de ingestão reduzida. Não foram observadas alterações nos parâmetros séricos entre os grupos. No entanto, na avaliação do perfil de lipoproteínas, verificou-se que os níveis de colesterol e proteína foram significativamente menores no grupo DNIn em relação ao CT. A avaliação de lipídeos hepáticos não demonstrou diferença entre os grupos. No entanto, foi observado que o grupo CTIn apresentou maior concentração de colesterol cecal que o grupo DN. A avaliação do estresse oxidativo mostrou diferença significativa na produção de Catalase, sendo que esta encontrava-se maior no grupo DNIn. Os demais parâmetros relacionados ao estresse oxidativo não apresentaram diferenças. A altura das vilosidades apresentou-se menor no grupo DNIn, quando comparado ao grupo CTIn. Não houve diferença estatística entre o grupo DN e o grupo DNIn. Quanto à área de muco, foi possível observar diferença estatística entre os grupos CT e DNIn. A análise imunohistoquímica da quantidade de *Giardia* na mucosa intestinal dos animais, não revelou diferenças significativas entre os grupos CTIn e DNIn. Em resumo, este estudo demonstrou que a giardíase em animais desnutridos produziu alterações metabólicas e na estrutura das microvilosidades, sugerindo o agravamento da doença em desnutridos.

## ABSTRACT

Giardiasis, intestinal infection caused by *Giardia lamblia* is an important cause of diarrhea and intestinal malabsorption. Several studies have evaluated the influence of this disease on nutritional status. However, the impact of giardiasis in malnourished is speculative and there is no evidence that characterize malnutrition as an aggravating factor of the disease. This study assessed the metabolic and histopathological effects of *G. lamblia* infection in previously malnourished animals. We used 32 gerbils, female, 4-6 weeks, divided into 4 groups: Control (CT) and Control Infected (CTIn), fed a diet with 20% protein; Malnourished (DN) and Malnourished Infected (DNIn) with a 5% protein diet. On the 28th day of the experiment, the animals in groups CTIn and DNIn were infected with *G. lamblia*, orally, remaining infected for 7 days, when all animals were euthanized and sampled blood, small intestine, liver and cecum content. The animals were weighed weekly using a scale. For biochemical evaluation, serum glucose, albumin, cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic assay, and the total protein was performed by the Bradford method. The fractionation of the serum lipoproteins was performed by Fast Protein Liquid Chromatography System. The determination of liver and cecal 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 small intestine was collected, fixed and intended for obtaining sections and staining with Hematoxylin & Eosin, Periodic Acid-Schiff and production of sections for immunohistochemistry. The villus height, mucus and trophozoites area were calculated using the software KS300 contained in Carl Zeiss image analyzer. Results were expressed as mean  $\pm$  standard error, using the Shapiro-Wilk test to verify the normality of the sample and Analysis of Variance followed by Tukey test for comparison between experimental groups. We used the statistical package SPSS version 20.0, considering a significance level of 5%. It was observed that gerbils fed a low protein diet had significantly lower body weight, and reduced intake. There were no changes in serum parameters between groups. However, in lipoprotein profile, it was found that levels of protein and cholesterol were significantly lower in group DNIn compared to CT. The evaluation of liver lipids showed no difference between groups. However, it was observed that the group CTIn showed higher concentration of cholesterol in cecum content than DN. The evaluation of oxidative stress was significantly different in catalase production, higher in DNIn than CT. The other parameters related to oxidative stress did not differ. The villus height was lower in the group DNIn when compared CTIn group. There was no statistical difference between the group and the group DN and DNIn. Regarding the area of mucus, we observed a statistical difference between groups CT and DNIn. Immunohistochemical analysis of the amount of *Giardia* trophozoites in the intestine of animals revealed no significant differences between groups CTIn and DNIn. In summary, this study demonstrated that giardiasis in malnourished animals produced metabolic changes in the structure of microvilli, suggesting worsening of the disease in malnourished.

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

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

### 1.1. Taxonomia e Nomenclatura

Os parasitos deste gênero pertencem ao filo Sarcomastigophora, à classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida, família Hexamitidae. Foram primeiramente propostos por Antoine van Leeuwenhoek em 1681, ao examinar as próprias fezes ao microscópio (Dobell 1920), entretanto, foi apenas em 1859 que Lambl descreveu detalhadamente um organismo 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 *Lamblia 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.

Baseado 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 têm 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, Plutzer et al, 2010).

### **1.2. Variação Genética**

O gênero *Giardia lamblia* pode ser considerado um complexo de espécies, cujas linhagens (A, B, C, D, E, F, G e H) apresentam pouca variação na sua morfologia, mas demonstram alterações genéticas que podem conferir a variação antigênica e a especificidade de hospedeiro, encontradas em cada uma delas (Monis et al, 2003). 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 (Thompson & Monis, 2004, Caccio et al, 2005, Robertson et al, 2010), uma vez que não apenas os fatores relacionados ao parasito, como genótipo, mas também características relacionadas ao hospedeiro, estão envolvidos na patogenia 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 e em uma amostra de gaivota (Caccio & Ryan, 2008, Lasek-Nesselquist et al, 2010).

### **1.3. 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 parte 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 (Elmendorf et al, 2003), responsáveis por conferir motilidade ao parasito (Ankarklev et al, 2010).

O trofozoíto é constituído 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, 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  $\beta$ -tubulina, proteínas contráteis e proteínas do citoesqueleto denominadas giardinas (Elmendorf et al, 2003, Palm et al, 2005). Uma vez que os protozoários do gênero *Giardia* não invadem os tecidos do hospedeiro, o estabelecimento da doença depende em grande parte, da capacidade do trofozoíto em aderir ao epitélio intestinal, por isso, o disco ventral é uma organela de suma importância neste processo (Carranza & Lujan, 2010).

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

A transmissão da giardiase ocorre predominantemente de forma indireta, pela ingestão de água ou 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 institucionalizados, 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).

Após a contaminação com os cistos viáveis, pelos hospedeiros susceptíveis, inicia-se então o ciclo da doença. A elevada resistência da parede cística, que permite a permanência do cisto no ambiente por longos períodos (Aguilar-Díaz et al, 2011), associada à baixa dosagem de inóculo necessário para estabelecer a infecção (Araújo et al, 2008), tornam a contaminação por *Giardia lamblia* bastante viável.

Os cistos, que no ambiente encontravam-se em estado de dormência, rapidamente tornam-se metabolicamente ativos, iniciando a excitação (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. Como não penetram o epitélio, nem invadem tecidos circundantes ou a corrente sanguínea, a colonização é restrita ao lúmen intestinal, sendo preferencialmente nas porções proximais do tecido (Ankarklev et al, 2010). Para seu desenvolvimento e replicação, absorvem nutrientes presentes na luz intestinal, sendo a glicose fonte de energia primária, podendo também utilizar aminoácidos e colesterol do hospedeiro (Adam 2001).

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 substituído, os trofozoítos são soltos no lúmen intestinal, e deverão “nadar contra a corrente” para conseguirem se ligar novamente aos 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).

A formação do cisto, que será liberado juntamente com as fezes do hospedeiro infectado, permite que o parasito sobreviva fora do hospedeiro, resistindo às condições adversas que o ambiente externo lhe proporcionará, perpetuando assim, o ciclo da doença (Carranza & Lujan, 2010).

### **1.5. Manifestações Clínicas**

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 graves (Adam 2001).

A infecção pode causar diarreia, perda de peso, desidratação, desconforto abdominal, má absorção, má digestão e esteatorréia (Buret 2008). A giardíase crônica, quando não há diagnóstico e tratamento da doença, pode levar à má absorção de lipídeos (Bansal et al, 2005), vitaminas lipossolúveis (Saki et al, 2011), zinco e ferro (Demirci et al, 2003), vitamina B<sub>12</sub>, sódio (Buret 2008) e reduzida ação de dissacaridases (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011).

Esta sintomatologia é decorrente da forte ligação entre lectinas presentes na superfície da *Giardia* e carboidratos presentes na superfície das células epiteliais, que leva à apoptose de enterócitos e, em seguida, perda de função da barreira intestinal, especialmente nos indivíduos com giardíase crônica, os quais não foram diagnosticados e tratados adequadamente (Chin et al, 2002, Panaro et al, 2007, Jenkins et al, 2009). Consequentemente há aumento da permeabilidade intestinal e encurtamento difuso das microvilosidades epiteliais, que poderá levar à redução na secreção de dissacaridases e hipersecreção de ânions, contribuindo com os

prejuízos na absorção de nutrientes e manifestações clínicas da doença (Jimenez 2004, Buret 2008, O'Hara & Buret, 2008, Koot et al, 2009).

O aumento da permeabilidade intestinal acarretará também na ativação de linfócitos TCD8+, que contribuirão ainda mais com o encurtamento difuso das microvilosidades da borda em escova, por mecanismos que ainda precisam ser elucidados, mas que envolvem seus efeitos citotóxicos (Scott et al, 2000, 2004, Troeger et al, 2007). Este dano então poderá ocasionar uma diminuição da superfície epitelial independentemente de atrofia das vilosidades induzida pela *Giardia*, já que a atrofia pode ou não ocorrer durante infecções por este patógeno, dependendo substancialmente da cepa do parasito (Behera et al, 2008, Koot et al, 2009). Ainda não foi demonstrado se os produtos da giárdia são capazes de degradar diretamente as proteínas envolvidas nas junções epiteliais (Cotton et al, 2011).

O aumento do peristaltismo intestinal também contribui com as manifestações clínicas observadas na giardíase, podendo ser resultante da desgranulação de mastócitos, de respostas imunes adaptativas (Li et al, 2007), ou até mesmo da própria má absorção de nutrientes e eletrólitos, que cria um gradiente osmótico, atraindo água para o lúmen intestinal (Troeger et al, 2007).

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

Neste contexto, deve-se ressaltar que o sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel fundamental nas várias manifestações da giardíase (Eckmann 2003). A infecção por *Giardia* tende a ser autolimitada em indivíduos com sistema imunológico competente, enquanto imunossuprimidos ou crianças estão em risco aumentado de desenvolver a giardíase crônica, agravando o estado nutricional destes pacientes (Koot et al, 2009, Cotton et al, 2011).

Com isso, esta doença, desde muito tempo, tem sido apontada como causa de distúrbio de crescimento em crianças, sendo a presença e a frequência da diarreia, a duração da infecção e a oportunidade de reinfecção, fatores considerados essenciais no deapauperamento físico e mental neste grupo etário (Simsek et al, 2004).

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 imunossuprimidos (Feitosa et al, 2001, Bachur et al, 2008, Gonçalves et al, 2009, Cardoso et al, 2011), seu impacto em desnutridos é especulativo, não havendo evidências que estabeleçam a desnutrição como fator agravante da doença.

### **1.6. Desnutrição**

A desnutrição, conforme definição da OMS é uma diversidade de condições patológicas, decorrentes de deficiências de energia ou proteína ou micronutrientes, em variadas proporções (Blössner & de Onis, 2005). A desnutrição pode causar diversos impactos sobre uma população como maior susceptibilidade e agravamento de doenças, mortalidade e pobreza, fatores que afetam consideravelmente o desenvolvimento econômico e social de uma nação (Blakely et al, 2004). Muitos fatores podem causar desnutrição, sendo que a maioria deles está associado com a má alimentação ou infecções graves repetidas, especialmente em populações carentes (Rice et al, 2000).

A desnutrição e as infecções entéricas frequentes reduzem a disponibilidade de nutrientes, devido ao aumento das necessidades metabólicas, alteração na absorção e transporte de nutrientes e aumento das perdas destes, por processos como, por exemplo, a diarreia (Emery 2005, Hodges & Gill, 2010). Além disso, foi proposto que deficiências nutricionais podem comprometer a integridade da mucosa intestinal, resultando em aumento da permeabilidade e diminuição da secreção de enzimas, podendo assim contribuir para a translocação bacteriana, e susceptibilidade a infecções (Ferraris & Carey, 2000).

### **1.7. Giardíase e Desnutrição**

O comprometimento da mucosa intestinal por patógenos, como a *G. lamblia*, pode também ser um fator desencadeador, e até mesmo agravante da desnutrição, por permitir uma translocação de macromoléculas que resultará em reações imunológicas e inflamatórias, criando um ciclo vicioso entre desnutrição, infecção e, conseqüentemente, maior grau de desnutrição (Lunn 2000, Herrera 2005).

Alguns pesquisadores, como Muniz-Junqueira e Queiroz (2002), em um estudo comparativo entre diversas enteroparasitoses, demonstraram que apenas as crianças infectadas por *G. lamblia* mostraram deficiência de peso-para-idade e peso-para-altura conforme os padrões de referência (Z-escore) estabelecidos pela OMS (WHO 1995).

No entanto, apesar do montante de estudos avaliando o impacto da giardíase em parâmetros do estado nutricional como, por exemplo, ganho de peso, relação peso-altura e altura-idade, estudos avaliando o impacto da desnutrição sobre estes mesmos parâmetros além de parâmetros metabólicos durante a giardíase são raros e inconclusivos.

### ***1.8. Epidemiologia Giardíase e Desnutrição***

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

Na Ásia, África e América Latina, onde cerca de 200 milhões de pessoas apresentam a doença sintomática, com cerca de 500,000 novos casos relatados a cada ano, a giardíase deve ser observada com especial cuidado, pois contribui de forma substancial para a geração de adultos com déficit no desenvolvimento físico e cognitivo (Bussatti et al, 2009).

No Brasil, sua prevalência varia conforme a localidade, as populações estudadas e a metodologia empregada no estudo. A faixa etária mais atingida é 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 do Brasil mostraram que na última década, a prevalência desta parasitose diminuiu, porém permanece elevada, variando de 4,7% a 27,5% (Carvalho-costa et al, 2007a, Pereira et al, 2007, Basso et al, 2008, Machado et al, 2008, Korkes et al, 2009, Menezes et al, 2009, Tashima et al, 2009, Moreno et al, 2010, Santos et al, 2012).

Quanto à desnutrição, os números também são alarmantes. A mortalidade global entre as crianças menores de 5 anos está em torno de 10, 6 milhões de mortes a cada ano, sendo que, destas, 53% (5,6 milhões) estão associadas à desnutrição (Kosek, et al, 2003, Bryce et al, 2005, Dahl & Yamada, 2008, Yamada, 2008). Além disso, estima-se que a subnutrição materna e infantil seja causa subjacente de 11% do total dos DALYs (anos de vida ajustados

por invalidez) totais global (Black et al, 2008). Segundo estimativas realizadas pela Organização das Nações Unidas (ONU), por volta do ano de 2025, um bilhão de pessoas, de uma população mundial estimada em 8 bilhões, pode sofrer de desnutrição protéica (ONU 2003). Na América do Sul, o Brasil é considerado o país com o maior número de subnutridos, com 15,6 milhões de pessoas, o que corresponde a 8% da população. Em termos relativos, o número de indivíduos desnutridos atenuou nos últimos 40 anos, no entanto, em termos absolutos este número tem diminuído muito pouco (de ONIs et al, 2004b).

### **1.9. Modelo Experimental**

O uso de modelos experimentais para estudo da giardíase permite a averiguação de possíveis agravos no funcionamento metabólico do indivíduo, possibilitando o direcionamento de novas estratégias de intervenção em humanos. Dentre os modelos experimentais propostos para estudar o desenvolvimento e a patogenia da infecção por *G. lamblia*, os gerbils (*Meriones unguiculatus*) permitem obter bons resultados devido ao tamanho, facilidade de manipulação, susceptibilidade à inoculação e principalmente devido à semelhança entre o padrão da giardíase nesses animais e em humanos (Eckmann, 2003, Araújo et al, 2008).

Considerando o exposto, este trabalho pretende avaliar os efeitos metabólicos e histológicos da infecção por *Giardia lamblia* em modelos animais previamente desnutridos.

*Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

A giardíase, parasitose de distribuição mundial, apresenta caráter cosmopolita e grande capacidade de dispersão, tornando-se a infecção parasitária mais frequente em países desenvolvidos, e com elevada prevalência em países em desenvolvimento. No Brasil, sua prevalência varia conforme a localidade, as populações estudadas e a metodologia empregada no estudo. A faixa etária mais atingida é a de lactentes e pré-escolares, constituindo-se, nessa população, um sério problema de saúde pública. A sintomatologia da doença é de expressão muito variável, podendo apresentar-se desde a forma assintomática até casos graves de diarreia com consequente déficit no desenvolvimento físico e cognitivo dos infectados.

A desnutrição, seja por deficiência de energia, proteína, vitaminas ou minerais, é um problema de saúde grave que demanda atenção particularmente nos países em desenvolvimento. É causa subjacente da morte de cerca de 5,6 milhões de crianças abaixo de 5 anos de idade, uma vez que provoca efeitos adversos sobre a composição corporal, funções metabólicas e nas respostas às doenças. A integração entre o metabolismo e a imunidade, que em condições normais é benéfica para a manutenção da saúde, pode se tornar deletéria em condições de baixo aporte energético, exemplificada pela imunossupressão característica de indivíduos desnutridos.

A sobreposição da desnutrição com a giardíase em países subdesenvolvidos pode levar a um ciclo de inflamação, má absorção e desnutrição grave o suficiente para levar o indivíduo a um depauperamento físico e cognitivo irreversíveis. Além disso, é importante ressaltar que a elevada mortalidade encontrada em crianças desnutridas, agravada por doenças infecciosas é evitável e tratável por intervenções acessíveis como o reforço dos sistemas de educação e saúde.

Sendo assim, estudar os efeitos da giardíase sobre animais previamente desnutridos pode contribuir no esclarecimento do assunto e, com isso, mobilizar e incentivar o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de ambas as doenças.

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Geral*

Avaliar os efeitos metabólicos e histopatológicos da infecção por *Giardia lamblia* em gerbils (*Meriones unguiculatus*) previamente desnutridos.

#### 3.2. *Específicos*

- Em animais infectados com *Giardia lamblia* e/ou desnutridos:
  - Analisar possíveis alterações nos parâmetros de crescimento;
  - Avaliar se ocorrem alterações nos níveis séricos de proteínas, lipídeos e glicose;
  - Avaliar se ocorrem alterações no perfil lipídico hepático e cecal e no estresse oxidativo;
  - Verificar se a infectividade é agravada pelo estado nutricional;
  - Avaliar se ocorrem alterações na altura das vilosidades e na produção de muco.

*Materiais e Métodos*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. *Modelo experimental*

Para este estudo foram utilizados 32 gerbils (*Meriones unguiculatus*), fêmeas, com idades entre 4 e 6 semanas. Os animais foram obtidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério do Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais (LAPI), durante o período experimental de 5 semanas, em gaiolas coletivas sob controle de temperatura e fotoperíodos de 12h, com livre acesso à água filtrada e dieta.

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

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no USO de Animais (CEUA) da UFMG com o número de protocolo: 070/10.

### 4.2. *Divisão de grupos e delineamento experimental*

Previamente ao início do experimento, os animais foram aclimatados durante cinco dias, recebendo ração comercial. Após este período, foram distribuídos de forma homogênea quanto ao peso corporal em quatro grupos de 8 animais cada: Controle (grupo CT, 20% de proteína), Controle Infectado (grupo CTIn, 20% de proteína), Deficiente em Proteína (grupo DN, 5% de proteína) e Deficiente em Proteína Infectado (grupo DNIn, 5% de proteína).

Cada animal de cada grupo foi marcado com ácido pícrico (10%) com sinais que permitiam a identificação individualmente.

A partir do primeiro dia de experimento (dia 0), os grupos DN e DNIn foram mantidos com dieta hipoprotéica, durante quatro semanas, afim de induzir a desnutrição. No mesmo período, os demais grupos recebiam a dieta controle, para manutenção do estado nutricional. Após esse período (dia 28), os animais dos grupos CTIn e DNIn foram infectados com *Giardia*, permanecendo a infecção por 7 dias, quando foram então eutanasiados. Entre o dia da infecção e da eutanásia, os grupos foram alimentados com as mesmas dietas que vinham recebendo previamente (Tabela 1). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos sob controle de luz e temperatura, e receberam água filtrada e a dieta mantida sob

refrigeração *ad libitum*. Os cuidados com a água e a ração garantiram a inexistência de qualquer outra fonte de infecção para estes animais durante todo o curso do estudo.

**Tabela 1. Representação esquemática do delineamento experimental.**

<b>Dia</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Alimentação</b>
<b>- 5</b>	Aclimação	Ração comercial
<b>0</b>	Início do experimento: indução da desnutrição nos grupos DN e DNIn	Grupos CT e CTIn: dieta controle (20% proteína); Grupos DN e DNIn: dieta deficiente em proteína (5% proteína)
<b>28</b>	Inoculação dos trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> no grupos CTIn e DNIn	Grupos CT e CTIn: dieta controle (20% proteína); Grupos DN e DNIn: dieta deficiente em proteína (5% proteína)
<b>35</b>	Eutanásia de todos os grupos.	Grupos CT e CTIn: dieta controle (20% proteína); Grupos DN e DNIn: dieta deficiente em proteína (5% proteína)

#### 4.3. Composição das Dietas

As dietas Controle e Deficiente em Proteína apresentaram o mesmo equivalente calórico. No entanto, a fonte protéica da dieta (caseína) foi diminuída da dieta ‘Deficiente em Proteína’ e substituída pela mesma quantidade de amido de milho. Com isso, a dieta Controle apresentava um percentual protéico de 20% enquanto a dieta Deficiente em Proteína apresentava 5% de proteína (Tabela 2).

**Tabela 2. Composição das dietas experimentais Controle e Deficiente em Proteína (g/kg).**

<b>Ingredientes</b>	<b>DIETAS (g/Kg)</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Deficiente em Proteína</b>
<b>Caseína</b>	200	50
<b>Sacarose</b>	100	100
<b>Óleo de soja</b>	70	70
<b>Celulose</b>	50	50
<b>Mistura de minerais</b> (Composição conforme o <i>American Institute of Nutrition 93– AIN-93</i> )	35	35
<b>Mistura de vitaminas</b> (Composição de acordo com o AIN-93)	10	10
<b>Amido de milho</b>	535	685
<b>Densidade calórica (Kcal)</b>	<b>3970</b>	<b>3970</b>

#### **4.4. Avaliação do ganho de peso corporal e ingestão alimentar**

No primeiro dia de experimento, no momento da divisão dos grupos, o peso corporal e a ingestão alimentar de cada animal foram registrados. Posteriormente, ambas as medidas foram mensuradas semanalmente. Para a determinação do ganho de peso corporal, foi subtraído do peso de cada animal o peso obtido na semana anterior e, para determinação da ingestão alimentar, quantificou-se a dieta ofertada, a sobra de dieta na parte superior da gaiola e o resto de dieta contida no fundo da gaiola (obtido por peneiração da maravalha). A diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a soma da sobra e resto forneceu o consumo semanal de dieta. Obteve-se a estimativa de ingestão alimentar semanal por animal, pela divisão entre o consumo semanal de cada gaiola pelo número de animais presentes nela.

#### **4.5. Avaliação da Desnutrição**

Com o objetivo de avaliar o estado nutricional dos animais e verificar a eficácia da dieta hipoprotéica quanto ao estabelecimento do quadro de desnutrição, foi realizada a pesagem semanal dos animais de todos os grupos, com o auxílio de uma balança eletrônica com escala (BL320H, Shimadzu). Foi construída uma curva de peso corporal para avaliar as diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

Além da avaliação ponderal, também foi avaliado o consumo alimentar, medido semanalmente, calculado pela divisão da estimativa de ingestão alimentar semanal por animal, pelo ganho de peso corporal do animal em gramas, no período respectivo.

#### **4.6. Cepa de *Giardia* e condições de cultivo**

A infecção por *Giardia lamblia* foi realizada utilizando-se trofozoítos da cepa Portland-1 (ATCC 30888), *Assemblage A*, oriunda do LAPI da UFMG, onde é mantida em cultura axênica e cultivada em meio TYI-S-33 (DIAMOND, 1978), modificado por Keister (1983) e suplementado com bile bovina.

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

#### **4.7. Ajuste do inóculo e infecção experimental**

No dia 28 do experimento (final da 4ª semana), os animais dos grupos CTIn e DNIn foram infectados com *Giardia lamblia*. Tubos de cultura contendo trofozoítos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos para que ocorresse o desprendimento dos parasitos da parede dos mesmos. Após este período, 25 µL do meio de cultura foram adicionados a um microtubo contendo 75 µL de corante vital (eosina 0,125%) e, em seguida, foi adicionado uma gota de formol tamponado 10% para imobilização dos trofozoítos. 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  $1 \times 10^6$  trofozoítos/mL.

Os animais foram inoculados por gavagem, com o auxílio de uma cânula DELVO nº 15, acoplada a uma seringa de 1 mL, conforme as recomendações do CETEA.

#### **4.8. Coleta de amostras durante o experimento**

As coletas de sangue que ocorreram no início do experimento foram feitas pelo plexo caudal, após anestesia dos animais por uma injeção intraperitoneal contendo solução de Ketamina (100 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg).

#### **4.9. Necropsia dos animais e coleta de materiais**

Ao final do experimento, após jejum de 12h, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo uma solução de Ketamina (100 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg). Realizou-se então, a abertura da cavidade peritoneal com incisão mediana, para a localização das vísceras. Foram retiradas amostras de sangue, intestino delgado, fígado e conteúdo cecal.

Após a coleta de sangue por punção cardíaca, os animais foram sacrificados para a coleta dos demais tecidos. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas por 3000 RPM durante 5 minutos e o soro foi armazenado a -20°C.

O intestino delgado foi inteiramente coletado (~18 cm), sendo que 6 cm foram destinados ao processamento de cortes histológicos e a porção restante para o diagnóstico por

contagem direta de trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal. O fígado foi removido inteiramente, perfundido com PBS e acondicionado a -20°C. O conteúdo cecal, ao ser retirado, foi seco em estufa a 60°C e também armazenado a -20°C.

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

#### ***4.10. Contagem de trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal***

Toda a porção restante do intestino delgado, não destinada à análise histológica foi encaminhada para a contagem dos trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal. Após abertura longitudinal e maceração do tecido, o mesmo foi acondicionado em solução salina tamponada com fosfato (PBS), a 4°C durante o período mínimo de 15 minutos e, finalmente, os trofozoítos desprendidos foram contados em Câmara de Neubauer.

#### ***4.11. Determinação da glicemia***

A glicemia foi determinada por ensaio enzimático (kit Labtest, Brasil) cujo princípio consiste na oxidação da glicose a ácido glucônico pela ação da enzima glicose oxidase, com liberação de peróxido de hidrogênio. Este, pela ação da peroxidase, em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 520nm.

Assim, 2µl do soro coletado foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, adicionando-se 200µl de reagente de cor. Após incubação de 15 min a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm em leitor de microplaca.

#### ***4.12. Dosagens séricas de proteínas totais e albumina***

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação

entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm.

Para realização de tal procedimento, 5µl de plasma foram colocados em microplaca de 96 poços, acrescentando-se 200µl de reagente de cor. Após incubação de 15 min a 37°C, a absorbância foi lida a 595 nm em leitor de microplaca.

A dosagem da albumina sérica foi determinada por ensaio enzimático (kit Labtest, Brasil). A metodologia do método se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 600 e 640nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra.

Para a medida, 2,5µl de soro foram adicionados à microplaca de 96 poços, junto com 250µl de reagente de cor. Após incubação de 5 min em temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 630nm em leitor de microplaca.

#### ***4.13. Avaliação do Perfil Lipídico Sérico***

##### ***4.13.1 Determinação das concentrações de colesterol total***

As concentrações de colesterol foram medidas com base no método de colesterol oxidase descrito por Allain et al (1974), utilizando-se kit comercial (Labtest, Brasil). O processo consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença de colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio, que, pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 500nm.

Para determinação das concentrações de colesterol no soro dos animais, inicialmente 5µL de amostra foram diluídas em água deionizada (1:50), afim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. Em seguida, 100µL de soro diluído foram pipetados em microplaca de 96 poços, sendo adicionados 100µL de reagente de colesterol total. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C a absorbância foi lida a 492nm em leitor de microplaca.

#### ***4.13.2 Determinação das concentrações de triglicerídeos***

As concentrações de triglicerídeos séricos foram mensuradas conforme o método enzimático colorimétrico descrito por Fossatti & Principe (1982), utilizando kit comercial (Labtest, Brasil). O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre. Esse é fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre ação da glicerol fosfato, o qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob ação da peroxidase, em presença de um reagente fenólico (4-clorofenol), e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo avermelhado, com máximo de absorção a 510nm.

Assim, 5µL de soro foram diluídos em água deionizada, na concentração de (1:100). Em seguida, 100µL da solução, foram pipetados em microplaca de 96 poços e 100 µL do reagente específico acrescentados. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C a absorbância foi lida a 492nm.

#### ***4.13.3 Separação de lipoproteínas e determinação de colesterol e proteínas nas frações***

O fracionamento das lipoproteínas séricas por cromatografia de filtração em gel foi realizado em um sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) modelo 600 da Waters, usando-se uma coluna Superose 6 10/30 da Pharmacia. Em suma, uma alíquota de 100 µl de soro de cada dois ou três animais, após filtrada em membrana de 0,45 µm, foi injetada na coluna e separada com um tampão contendo NaCl 0,15 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01 M e EDTA 0,1 mM, pH 7,5, a um fluxo de 0,25 ml/minuto.

Os níveis de colesterol nas frações foram determinados da seguinte maneira: 100 µl de cada fração separada anteriormente por FPLC, foram retirados e misturados na proporção 1:1 com o reagente específico em microplacas de 96 poços. Após um período de incubação de 20 minutos a 37°C, a absorbância a 492 nm foi lida em leitor de microplaca.

Para determinação dos níveis de proteína nas frações lipoproteicas, utilizou-se a diferença de absorbâncias obtidas espectrofotometricamente. Em resumo, 100 µL das frações coletadas foram colocados em uma cubeta de quartzo, e lidas nas absorbâncias de 280 e 260 nm. O valor final foi obtido pela subtração da absorbância final pela inicial.

#### ***4.14. Determinação de colesterol total e triglicerídeos hepáticos e cecais***

A determinação do perfil lipídico hepático e cecal foi feita mediante a extração destes por solvente orgânico, conforme descrito por Folch et al (1956). Em resumo, procedeu-se da seguinte forma: 100mg de tecido hepático ou conteúdo cecal foram homogeneizados, em tubo de vidro, com 1900µL de solução clorofórmio:metanol (2:1). Foram acrescentados 400µL de metanol, a jato forte, e centrifugados a 3000rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro previamente pesado e acrescido de 800µL de clorofórmio e 640µL de NaCl 0,73%, jato forte. Após homogeneização lenta, os homogenatos foram centrifugados durante 5 minutos a 3000rpm. A fase superior foi desprezada, a parede dos tubos lavadas 3 vezes com 600µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%) que então, foram colocados para secar em estufa, a 60°C, por 24 a 48 horas. Para a determinação dos níveis de colesterol total e triglicerídeos, os extratos lipídicos foram ressuspensos em 500 µL de isopropanol, dos quais 100µl foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, adicionando-se 200µl 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.

#### ***4.15. Avaliação do Estresse Oxidativo***

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

A dosagem da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – técnica de TBARS foi avaliada da seguinte maneira: os homogenatos de fígado foram colocados em tubos de vidro, aos quais adicionou-se a solução TBARS (ácido tricloroacético + ácido tiobarbitúrico + HCl + água deionizada). Em seguida, os tubos permaneceram em banho-maria fervente por 15 minutos, sendo posteriormente resfriados em água corrente. Após o resfriamento foi acrescentado o álcool butílico com posterior homogeneização e centrifugação a 3000rpm. Por fim, 200 µL do sobrenadante foram pipetados em microplaca de 96 poços seguida de leitura em leitor de microplaca a 535nm.

#### **4.15.2 Dosagem da atividade da enzima antioxidante catalase**

A dosagem da atividade da enzima catalase se baseia do decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) - (Abs240) pela metabolização deste pela catalase ( $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ) (Nelson & Kieson, 1972). Resumindo, 25 $\mu$ L de homogenado de fígado em tampão fosfato (50mM) diluído em (1:25) foram acrescentados a 1mL de tampão fosfato 50mM em uma cubeta de quartzo. Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura de tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado foi expresso por concentração de proteína (mg/mL), dosada pelo método de Lowry (1951).

#### **4.15.3 Dosagem da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase**

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade de limpar o radical  $O_2^-$ , diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogallol (adaptado de DIETERICH et al, 2000). Resumindo, 30 $\mu$ L de homogenato de tecido em tampão fosfato (50mM) foram plaqueados em placa de 96 poços e acrescidos de 99 $\mu$ L de tampão fosfato, 6 $\mu$ L de MTT (brometo de dimetiliazol – difeniltetrazolium) e 15 $\mu$ L de pirogallol. Após 5 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com 150 $\mu$ L de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância lida a 570nm. Para o cálculo do resultado, considerou-se que 1 unidade (U) de SOD foi capaz de auto-oxidação de 50% de pirogallol do padrão. O resultado foi expresso em Unidade por mg de proteína.

#### **4.16. Histopatologia e morfometria da mucosa intestinal**

Durante a necropsia foi coletada a porção proximal do intestino delgado (extensão de 6 cm), que foi aberta longitudinalmente e dividida em 2 fragmentos para fixação em formol tamponado 10% pH 7,2. Após o período de fixação, todos os fragmentos coletados foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina, para obtenção de cortes com 4  $\mu$ m de espessura. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foram feitas reações imunohistoquímicas para identificação de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Todos os cortes histológicos da porção proximal do intestino delgado corados com H&E foram visualizados pela objetiva de 10X do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) para a digitalização aleatória de 30 vilosidades intestinais por meio da microcâmara JVC TK-

1270/RGB (*Tokyo, Japan*). A altura das vilosidades foi calculada através do software KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. A base das vilosidades foi delimitada manualmente através de ferramentas do software, todos os pixels com tons de violeta, vermelho e bonina foram selecionados para criação de uma imagem binária e a altura das vilosidades foi calculada automaticamente.

Para o cálculo da área ocupada por muco nas vilosidades intestinais foram utilizados os cortes histológicos corados com PAS. As lâminas foram visualizados pela objetiva de 40X do microscópio Axiolab para a digitalização aleatória de 30 imagens intestinais por meio da mesma microcâmara descrita previamente. Todos os pixels com tons de bonina das regiões PAS<sup>+</sup> foram selecionados para a criação de uma imagem binária e para a obtenção da área de muco em  $\mu\text{m}^2$ , conforme descrito por Oliveira et al (2012).

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

#### **4.17. Reação imunohistoquímica e análise quantitativa para trofozoítos**

Os cortes para processamento em imunohistoquímica foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40vv a 0,2% em 200 ml de PBS por 20 minutos. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando-se os cortes com soro de cabra diluído a 1:40 por 40 minutos. As lâminas foram incubadas com soro policlonal anti-*G. lamblia* diluído a 1:1000 (produzido nos Laboratórios de Amebíase e Protozoários Intestinais/Depto Parasitologia e de Protozooses/Depto Patologia Geral) e, em seguida, incubados com IgG biotinizada diluída a 1:50 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) a 1:100. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40vv à 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos obtidos de lesões ricas em *Giardia*. Como controle negativo, o antisoro 1<sup>o</sup> foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris concentrada por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan.

Após a reação, toda a superfície mucosa da porção proximal do intestino delgado foi visualizada através da objetiva de 10X e digitalizada por meio da mesma microcâmara. Todos os pixels com tons de marrom dos trofozoítos marcados pela imunohistoquímica foram

selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área total de marcação. Processamento digital e recursos do software KS300 foram utilizados para eliminar artefatos.

#### ***4.18. Análise Estatística***

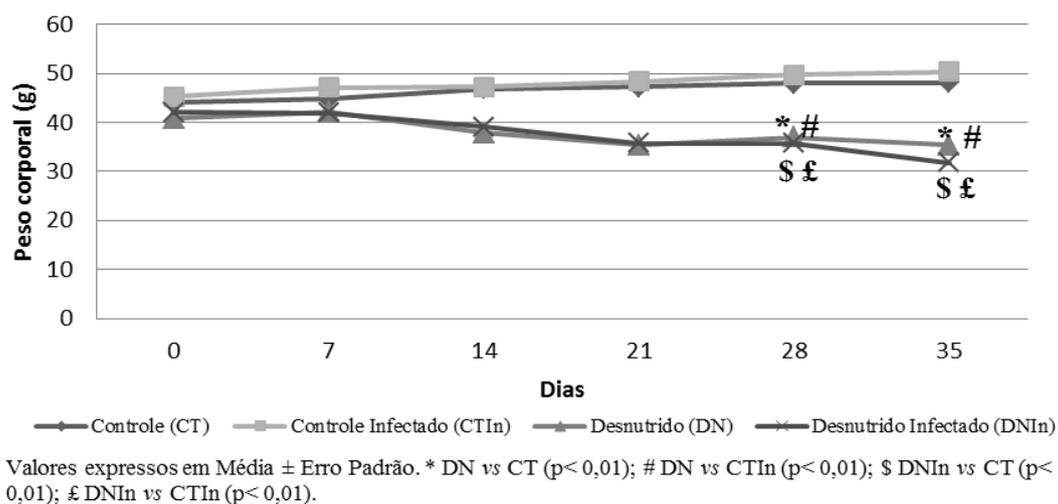
Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. Utilizaram-se os testes de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra e para comparação entre os grupos experimentais, a Análise de Variância (ANOVA) e Tukey para os valores que seguiram normalidade e Kruskal-Whalis e Dunn para aqueles que não seguiram. Todos os testes e análises foram realizados no pacote estatístico SPSS versão 20.0, considerando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

*Resultados*

## 5. RESULTADOS

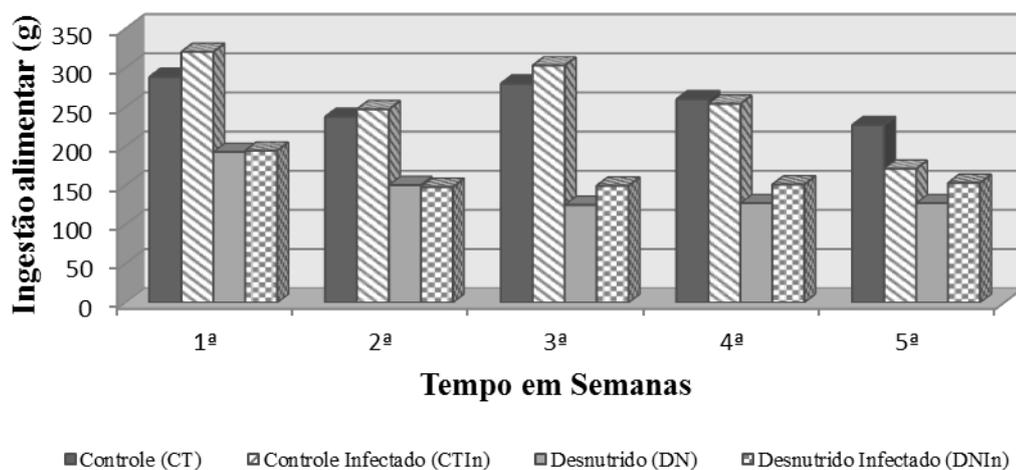
No início do experimento, os grupos apresentavam-se homogêneos, com parâmetros bioquímicos sem diferenças significativas entre si.

A figura 1 apresenta a evolução do peso corporal dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn ao longo do período experimental.



**Figura 1.** Evolução do peso corporal dos animais durante o experimento.

Após quatro semanas de dieta hipoprotéica, o peso dos animais dos grupos DN ( $37,0 \pm 1,03$ ) e DNIn ( $35,75 \pm 2,11$ ), foi significativamente menor que o peso dos animais dos grupos CT ( $48,02 \pm 3,03$ ) ( $p < 0,01$ ) e CTIn ( $49,75 \pm 2,25$ ) ( $p < 0,01$ ), permanecendo assim até o final do experimento. O consumo alimentar dos animais está apresentado na figura 2.



**Figura 2.** Consumo alimentar dos animais durante o experimento.

Observou-se que desde a primeira semana de experimento, os animais dos grupos DN e DNIn apresentaram consumo alimentar semanal menor que os animais dos grupos CT e CTIn. Os animais dos grupos CT e CTIn apresentaram ingestão alimentar semelhante até a 4ª semana de experimento, após a qual houve redução da ingestão alimentar do grupo CTIn.

Quanto à contagem de trofozoítos, foi encontrada maior quantidade de *Giardia* no lavado intestinal do grupo CTIn (média de 14,62) do que no grupo DNIn (média de 9,62). Não foram encontrados trofozoítos de *G. lamblia* nos grupos CT e DN.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos séricos estão apresentados na tabela 3.

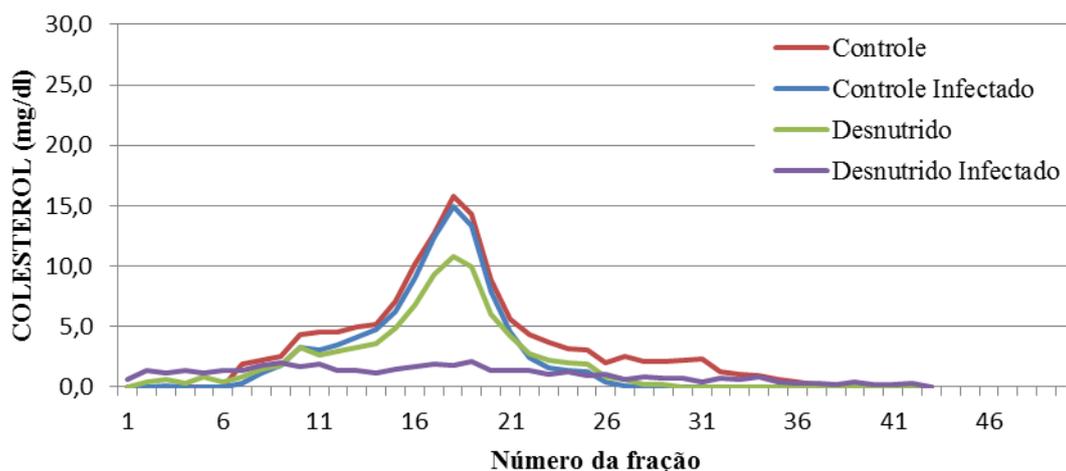
**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn no final do experimento.

PARÂMETROS					
GRUPOS	Glicemia (mg/dL)	Proteínas Totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
CT (n=8)	91,52 ± 4,63	5,78 ± 0,64	3,56 ± 0,64	136,57 ± 16,52	162,72 ± 26,82
CTIn (n=7)	100,48 ± 8,21	6,99 ± 0,04	3,98 ± 0,29	119,75 ± 8,77	105,96 ± 18,14
DN (n=5)	101,29 ± 14,80	7,08 ± 0,04	2,89 ± 0,29	105,40 ± 6,78	128,04 ± 16,90
DNIn (n=8)	88,18 ± 4,80	6,92 ± 0,06	4,83 ± 1,12	118,01 ± 9,22	99,68 ± 6,36

Valores expressos em Média ± Erro Padrão.

Não houve diferença significativa nos resultados de glicemia, proteínas totais, albumina, colesterol total e triglicerídeos, entre os grupos no final do experimento.

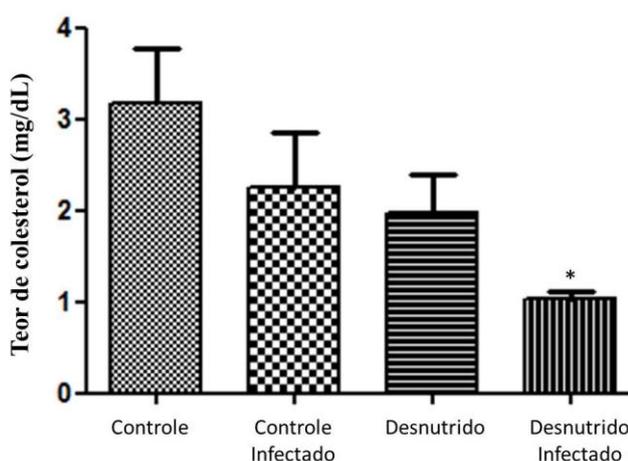
A figura 3 apresenta a distribuição de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.



**Figura 3.** Distribuição de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

Os grupos CT, CTIn e DN apresentaram a mesma distribuição de colesterol no perfil de lipoproteínas circulantes. Houve diferença significativa no perfil de lipoproteína do grupo DNIn em relação ao grupo CT.

A figura 4 mostra o teor de colesterol nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

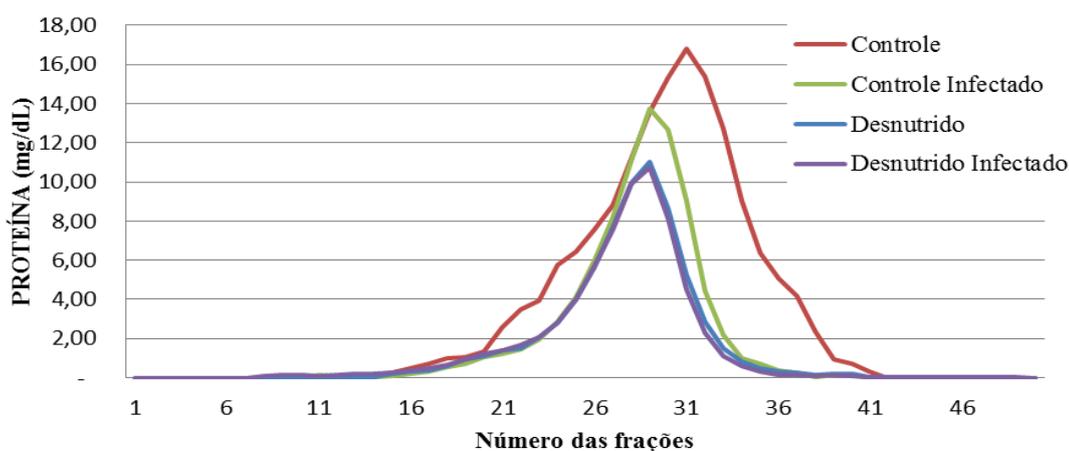


\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle.

**Figura 4.** Teor de colesterol nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

Os animais do grupo DNIn tiveram menor teor médio de colesterol nas lipoproteínas quando comparados aos animais do grupo CT. Não houve diferença nos níveis médios de colesterol nas frações de lipoproteínas entre os grupo CT, CTIn e DN.

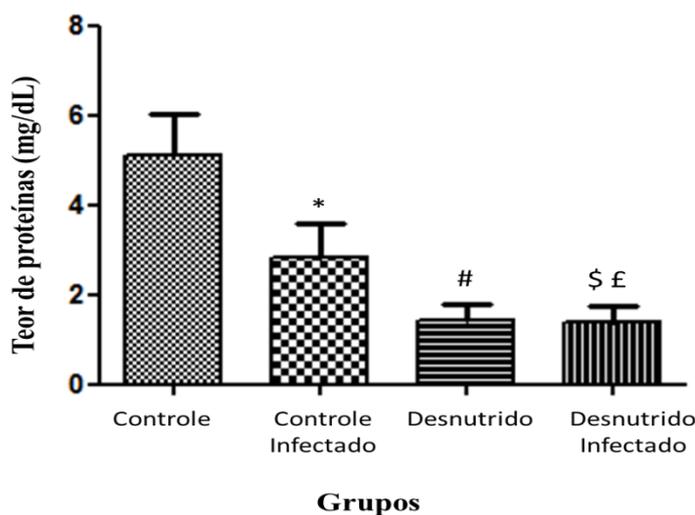
A figura 5 mostra a distribuição de proteínas nas frações de lipoproteínas circulantes dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.



**Figura 5.** Distribuição de proteínas nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

Os grupos CT, CTIn, DN e DNIn apresentaram diferenças significativas na distribuição de proteínas no perfils de lipoproteínas circulantes.

A figura 6 apresenta o teor de proteínas nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.



**Figura 6.** Teor de proteínas nas frações de lipoproteínas dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

\*  $p < 0,05$  em relação ao CT; #  $p < 0,0001$  em relação ao CT; \$  $p < 0,0001$  em relação ao CT; £  $p < 0,01$  em relação ao CTIn.

Os resultados mostram que a distribuição de proteínas nas frações foi diferente entre os grupos CT e CTIn ( $p < 0,05$ ), CT e DN ( $p < 0,0001$ ), CT e DNIn ( $p < 0,0001$ ), CTIn e DNIn ( $p < 0,01$ ), porém apresentou-se semelhante entre os grupos DN e DNIn ( $p = 0,4$ ).

A tabela 4 apresenta o perfil lipídico hepático e cecal dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn no final do experimento.

**Tabela 4.** Perfil lipídico hepático e cecal dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn no final do experimento.

<b>PARÂMETROS (mg/g de tecido)</b>				
<b>GRUPOS</b>	<b>Colesterol Hepático Total</b>	<b>Triglicerídeo Hepático Total</b>	<b>Colesterol Cecal Total</b>	<b>Triglicerídeo Cecal Total</b>
CT	14,44 ± 3,9	25,80 ± 10,25	2,06 ± 0,09	0,75 ± 0,06
CTIn	6,98 ± 1,24	5,73 ± 0,94	2,17 ± 0,19	0,77 ± 0,12
DN	24,23 ± 6,22	15,99 ± 5,50	1,42 ± 0,13*	0,39 ± 0,04
DNIn	13,71 ± 2,66	10,87 ± 4,08	1,72 ± 0,15	0,68 ± 0,19

Valores em Média ± Erro Padrão. \*  $p < 0,05$  em relação ao CTIn.

Não houve diferença significativa nos resultados de colesterol e triglicerídeos hepáticos. Houve diferença entre o resultado de colesterol cecal dos animais do grupo DN e CTIn ( $p < 0,05$ ).

A tabela 5 apresenta os resultados das medidas dos parâmetros de estresse oxidativo hepático dos animais dos grupos Controle, Controle Infectado, Desnutrido e Desnutrido Infectado.

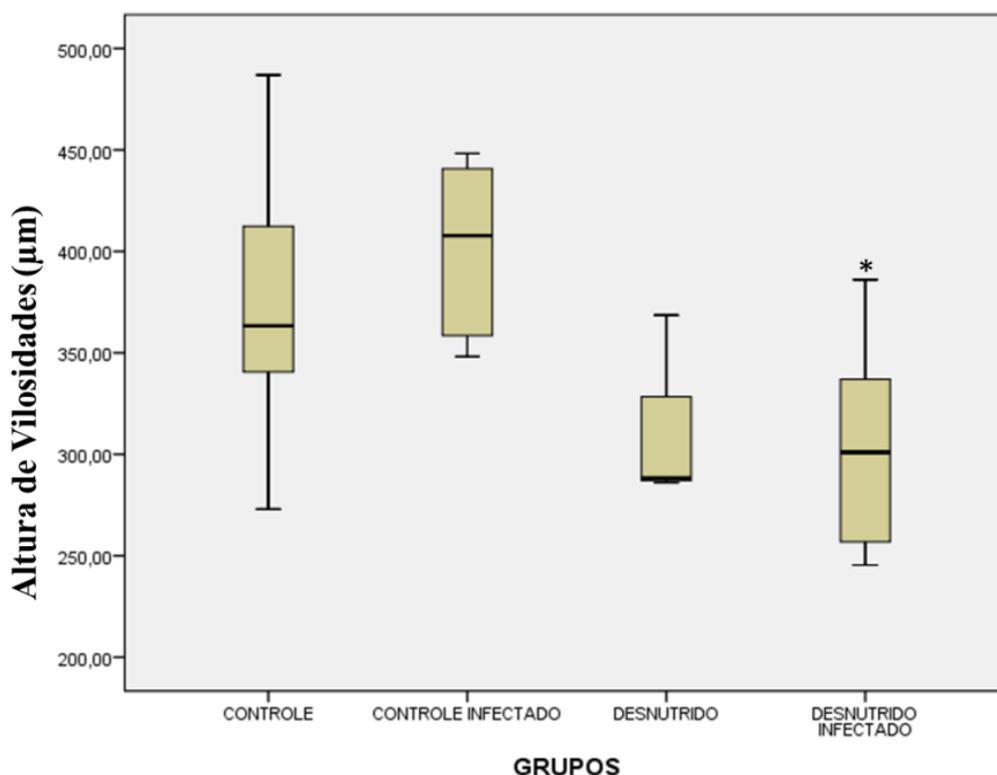
**Tabela 5.** Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo hepático dos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

<b>PARÂMETROS</b>			
<b>Grupos</b>	<b>TBARs</b>	<b>SOD</b>	<b>CATALASE</b>
CT	6,99 ± 2,09	0,053 ± 0,006	2,87 ± 0,87
CTIn	8,02 ± 2,22	0,044 ± 0,007	3,86 ± 1,18
DN	3,84 ± 1,93	0,060 ± 0,012	4,50 ± 1,25
DNIn	3,66 ± 1,12	0,048 ± 0,009	6,79 ± 0,74*

Valores expressos em Média ± Erro Padrão. \*  $p < 0,05$  em relação ao CT.

Não houve diferença na produção média de TBARs no fígado dos animais dos grupos avaliados. Foi verificada maior atividade hepática da enzima Catalase nos animais do grupo DNIn em relação ao grupo CT. Não houve diferença na atividade da enzima SOD hepática.

A figura 7 apresenta a altura de vilosidades intestinais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

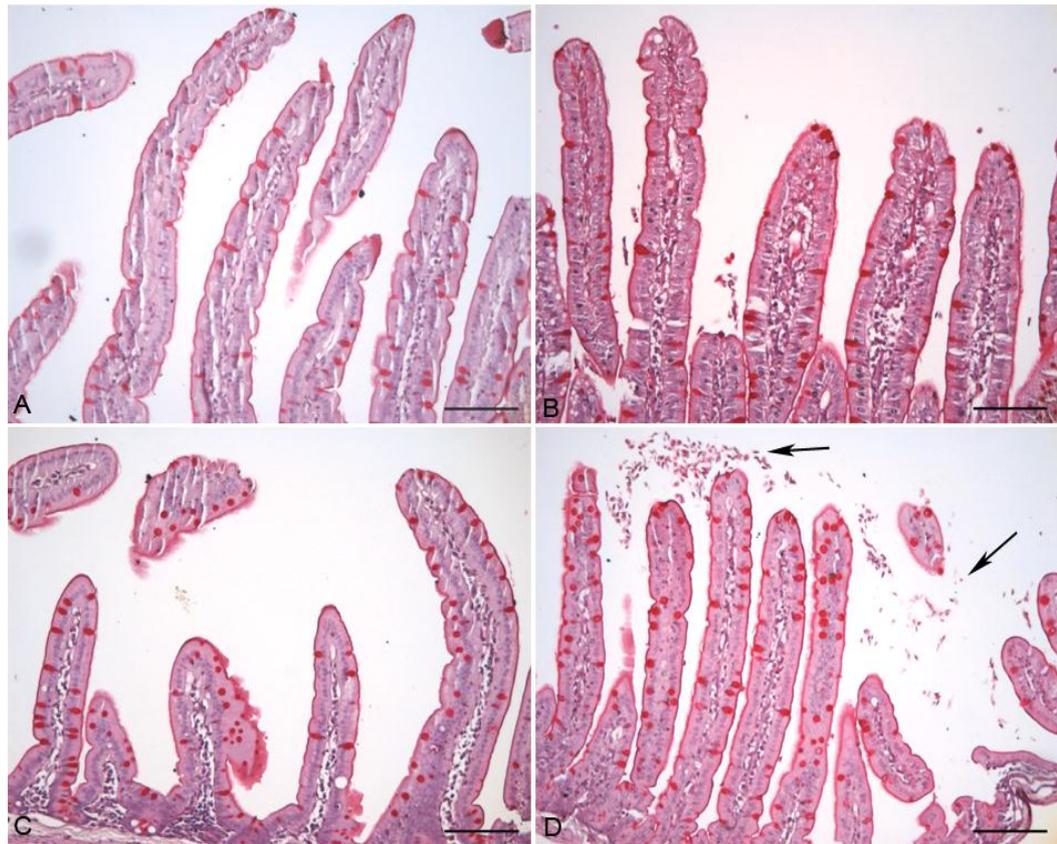


**Figura 7.** Altura de Vilosidade ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos experimentais.

Valores em  $\pm$  E.P.; \*  $p < 0,05$  em relação ao Grupo CTIn.

Os animais do grupo DNIn apresentaram menor altura de vilosidades intestinais em relação aos animais do grupo CTIn ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

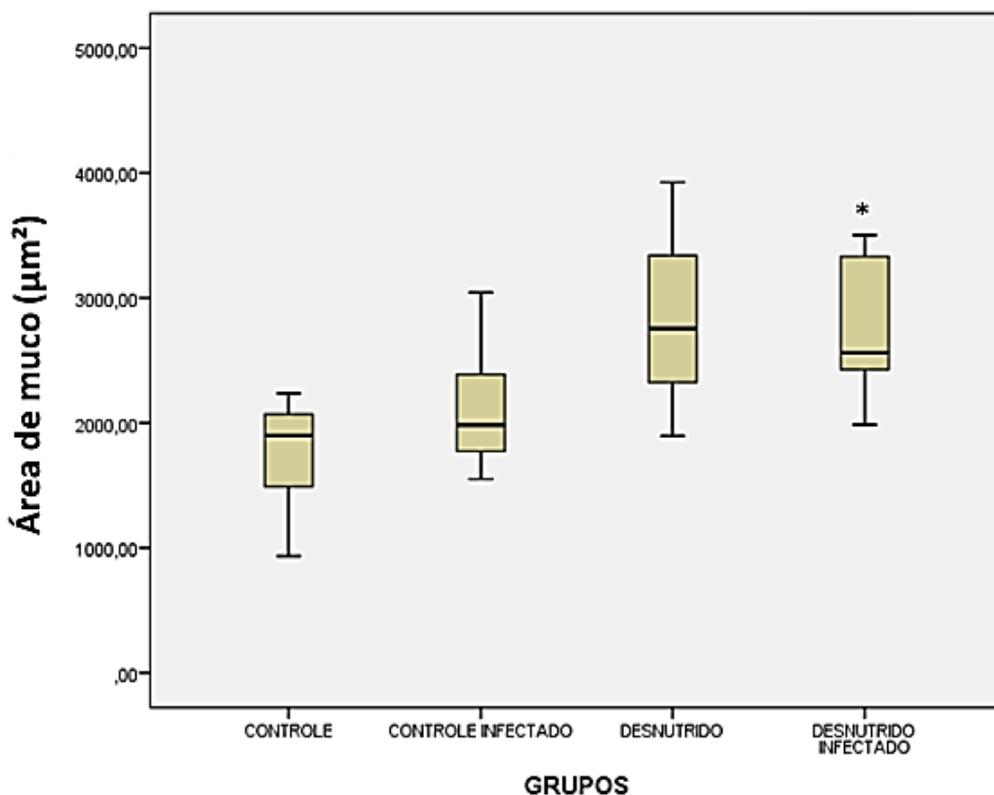
A fotomicrografia das vilosidades intestinais destacando as células caliciformes dos animais dos diferentes grupos experimentais está apresentada na figura 8.



**Figura 8. Fotomicrografia de intestino delgado de Gerbils controle e inoculados com trofozoítos de *Giardia lamblia*.** Pequeno número de células caliciformes PAS<sup>+</sup> nas vilosidades intestinais é observado nos animais do grupo CT (A); Discreto aumento do número de células caliciformes PAS<sup>+</sup> é observado nos animais do grupo CTIn (B); as vilosidades intestinais dos animais dos grupos DN (C) e DNIn (D) mostraram aumento visível de células caliciformes e, conseqüentemente, da produção de muco. Observar grande número de trofozoítos junto às vilosidades intestinais e lúmen intestinal (setas) em animal do grupo DNIn. Ácido Periódico de Schiff (PAS). Barra = 100 µm.

É possível observar que nos animais do grupo CT, há um pequeno número de células caliciformes positivas para o Ácido Periódico de Schiff (PAS) nas vilosidades intestinais. Nas vilosidades intestinais dos animais do grupo CTIn, é observado um discreto aumento do número de células caliciformes positivas para o PAS. Nas vilosidades dos animais dos grupos DN e DNIn, é evidenciado um aumento visível de células caliciformes e, conseqüentemente, da produção de muco. Pode-se observar ainda, um grande número de trofozoítos junto às vilosidades intestinais e lúmen intestinal no animal do grupo DNIn.

A figura 9 apresenta a área de produção de muco nas vilosidades intestinais dos animais dos diferentes grupos.

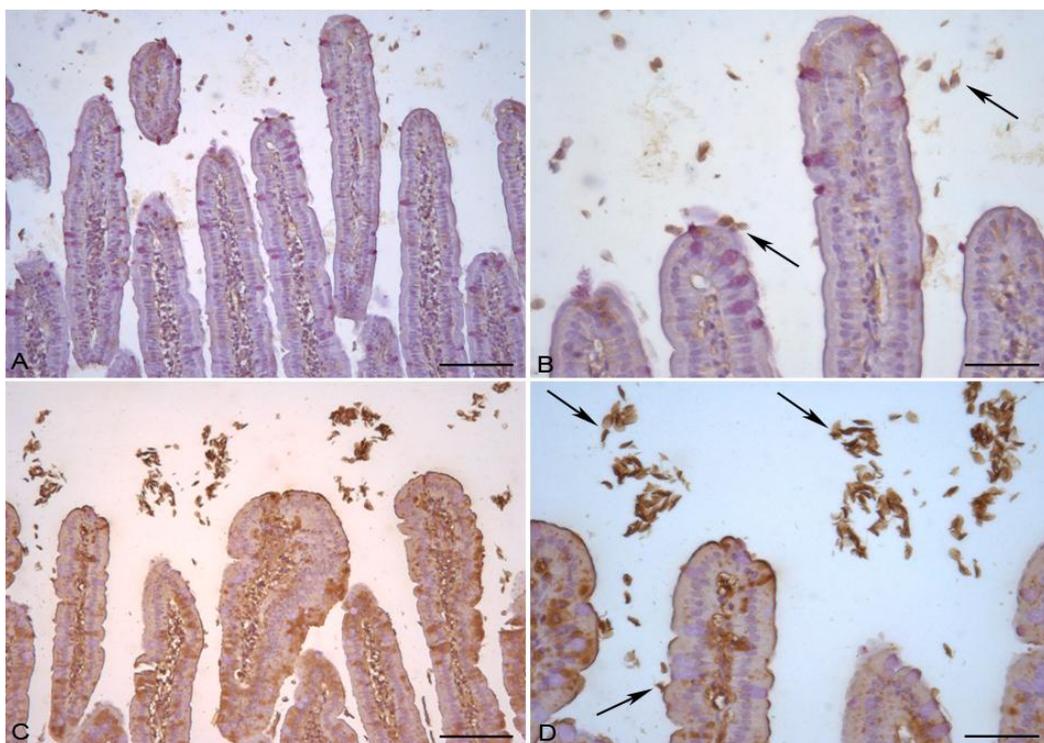


**Figura 9.** Produção de muco ( $\mu\text{m}^2$ ) pelos animais dos grupos CT, CTIn, DN e DNIn.

Valores expressos em  $\pm$  E.P. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo CT.

Os resultados mostram que os animais do grupo DNIn apresentaram maior área de produção de muco em relação ao grupo CT. Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

A figura 10 mostra os resultados da análise imunohistoquímica para trofozoítos de *G. lamblia* na mucosa intestinal.



**Figura 10. Reação imunohistoquímica para trofozoítos de *Giardia lamblia*.** (A) Grupo Controle Infectado. Presença de trofozoítos no lúmen intestinal e aderidos nas vilosidades intestinais. (B) Maior aumento da mesma região. Trofozoítos (setas). (C) Grupo Desnutrido Infectado. Grande número de trofozoítos positivos. (D) Maior aumento da imagem anterior, mostrando vários trofozoítos livres no lúmen e aderidos às vilosidades intestinais (setas). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 µm.

A análise qualitativa demonstra uma maior presença de parasitos imunomarcados nos animais do grupo DNIn em relação aos animais do grupo CTIn.

A análise quantitativa da quantidade de *Giardia* na mucosa intestinal dos animais, não revelou diferenças significativas entre os grupos CTIn ( $42958,95 \pm 10826,02 \mu\text{m}$ ) e DNIn ( $53298,21 \pm 8956,17\mu\text{m}$ ).

*Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

A desnutrição é um mal que aflige cronicamente a humanidade. A ONU vem apresentando dramáticas estatísticas sobre a situação alimentar no mundo, destacando que um bilhão de pessoas na América Latina, Ásia e África, sofrem de desnutrição crônica (Elia 2000, Douglas 2002). A desnutrição, em suas diferentes formas, constitui fator de risco grave para o aumento de morbidade e mortalidade em uma população, estando associada à morte de quase 5,6 milhões de crianças (Kosek, et al, 2003, Blössner & de Onis, 2005, Bryce et al, 2005, Dahl & Yamada, 2008, Yamada, 2008).

Doenças infecciosas e parasitárias são agravadas pelo estado nutricional especialmente em países em desenvolvimento, onde a prevalência de tais doenças é mais acentuada (Blakely et al, 2004). Isso porque o aporte inadequado de nutrientes acarreta mudanças antropométricas, metabólicas, assim como na morfologia intestinal (Emery 2005, Nakajima et al, 2008, Herems et al, 2008), diminuindo a capacidade do organismo no combate a patógenos (Eckman 2003).

A giardíase constitui uma destas enfermidades e, como atinge principalmente crianças, pode acarretar déficit cognitivo e de crescimento nos parasitados. Contudo, muitas infecções podem manter-se assintomáticas. Especula-se que o estado nutricional constitua fator determinante na gravidade da giardíase (Gendrel et al, 2003), entretanto, não existem evidências que confirmem a participação da desnutrição neste processo. Neste contexto, procuramos contribuir no esclarecimento do assunto avaliando as alterações metabólicas e intestinais de gerbils experimentalmente infectados com *G. lamblia* previamente submetidos à dieta hipoprotéica.

De acordo com Abreu et al (2006), a desnutrição protéica gera diversas manifestações clínicas nos modelos animais, porém as alterações mais aparentes são aquelas verificadas no peso, tanto do corpo como um todo, quanto de diversos órgãos. No presente estudo, observou-se que os gerbils alimentados com dieta hipoprotéica apresentaram peso corporal significativamente menor em relação àqueles que receberam dieta normoprotéica. A diminuição significativa do peso corporal como consequência da ingestão de dietas deficientes em proteínas é uma resposta amplamente encontrada e relatada na literatura (Melo et al, 2008, Costarelli & Emery, 2009, Valadares et al, 2010, Shukla & Shidu, 2011), ocorrendo mesmo após curtos períodos de oferta da dieta hipoprotéica, como demonstrado por Malafaia et al (2009).

As alterações significativas de peso podem ser justificadas pelas modificações bioquímicas acarretadas no organismo durante a privação protéica. Como as proteínas representam o principal componente estrutural e funcional de todas as células do organismo, o

tecido muscular esquelético é extremamente sensível à deficiência de proteína (Ihemelandu 1985, Parada-Simão 2011). Sendo assim, nos períodos de carência deste nutriente, o tecido muscular é degradado, para proporcionar aminoácidos que serão utilizados na gliconeogênese hepática, bem como na síntese de células de fase aguda e de enzimas, por exemplo (Biolo et al, 2002). Conseqüentemente, pode ocorrer grande perda de massa muscular e por sua vez, diminuição na massa corporal, explicando, em grande parte, a redução significativa da massa corpórea dos animais submetidos à dieta de hipoprotéica.

O efeito na redução do peso dos animais dos grupos DN e DNIn, foi acompanhado pela menor ingestão dietética destes dois grupos, desde o início do experimento, fato que também pode explicar a elevada perda de massa corpórea dos animais, conforme proposto por Vituri et al (2008).

A diminuição da ingestão observada era esperada, uma vez que o organismo animal exibe este comportamento anorético na tentativa de evitar maiores alterações no balanço nitrogenado negativo ocasionado pela dieta ofertada (Souza et al, 2001). A anorexia também pode ser explicada pela eventual diminuição nas concentrações plasmáticas de aminoácidos de cadeia ramificada, agentes orexígenos capazes de reduzir, por competição, a captação de triptofano no cérebro o que, por consequência, acarretará em diminuída síntese de serotonina (Cangiano et al, 1996).

Como foi demonstrado, após o inóculo de *Giardia lamblia*, os animais do grupo CTIn também apresentaram redução na ingestão alimentar, porém sem alterações ponderais evidentes. A menor ingestão neste grupo pode ter ocorrido em decorrência do processo infeccioso, levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e, portanto inibição do apetite (Bayraktara et al, 2005).

Não foram observadas diferenças significativas na glicemia dos diferentes grupos, CT, CTIn, DN, DNIn. Durante a privação, o organismo utiliza de diversos mecanismos para manutenção da glicemia, uma vez que a glicose é o principal componente energético celular. Sendo assim, a desnutrição pode causar hipoglicemia ou hiperglicemia, dependendo da gravidade e da duração do estado de carência. Em nosso modelo os níveis glicêmicos dos animais DN e DNIn se mantiveram próximos aos dos controles. Interessantemente, os gerbils foram extremamente acometidos com a desnutrição induzida. Foi possível observar redução do peso, debilidade geral dos animais tendo alguns deles evoluído para o óbito. A glicemia normal pode refletir o tipo de desnutrição induzida, a qual há redução apenas no teor de proteínas da dieta, mantendo-se o aporte calórico aos animais. Neste caso, alterações metabólicas são esperadas, inclusive na expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose, a fim de manter a homeostase (Delghingaro-Augusto et al, 2004).

Alguns estudos demonstraram que a giardíase pode levar à diminuição na atividade das dissacaridases (Belosevic et al, 1989, Buret et al, 1990, Mohammed & Faubert, 1995, Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011), mas este efeito parece não prejudicar a absorção de glicose, como demonstrado por estudo recente (Gomes et al 2012).

Os níveis de proteínas totais e albumina séricos permaneceram similares nos grupos CT, CTIn, DN e DNIn. Com relação ao grupo CTIn, embora não tenha sido amplamente estudado, sugere-se que certas infecções entéricas como as provocadas por *Salmonella*, *Shigella*, rotavírus, e *Giardia lamblia* possam danificar a mucosa intestinal levando a uma perda excessiva de proteínas (Umar & DiBaise, 2010, Braamskamp et al, 2010). No entanto nos casos de infecção por *Giardia*, os níveis séricos de proteínas estariam alterados somente nos casos de co-infecção com outro microorganismo intestinal (Dubey et al, 2000).

Alterações nos níveis de proteínas totais e albumina em modelos animais submetidos à dieta hipoprotéica são comumente esperados (Nakajima et al, 2008, Perampalli et al, 2010, Shukla & Shidu, 2011). Isso porque a albumina é o principal constituinte das proteínas do plasma assim, deficiências protéicas podem levar a hipoalbuminemia, sendo este estado considerado uma das principais alterações da desnutrição. Uma evidência que nosso modelo, submetido à dieta hipoprotéica, respondeu ao tratamento foi a perda de peso, já discutida anteriormente. No entanto não pudemos comprovar a deficiência protéica a nível sérico. Este resultado talvez possa ser explicado pelo modelo utilizado, gerbil, também conhecido como rato do deserto, raramente usado como modelo para desnutrição.

O presente estudo não verificou diferenças nos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos nos grupos de animais experimentais. Diversos autores já relataram que o parasito *G. lamblia* utiliza-se do colesterol dos hospedeiros para a própria nutrição e crescimento, sendo que a privação deste nutriente pode, inclusive, determinar a diferenciação do parasito para sua forma de resitência (Lujan et al, 1996, Adam 2001). Além disso, baixos níveis de colesterol sérico são relatados em casos de desnutrição e especialmente observados em casos de má absorção (Acosta Escribano et al, 2005). Estudo realizado por Bonnefoy et al (2002) em pacientes hospitalizados, encontrou que os baixos níveis de lipídeos séricos, incluindo o colesterol, estão associados com a má nutrição, e ainda, com inflamação. Trabalho recente realizado por Saki et al (2011), revelou que indivíduos com giardíase apresentavam menores níveis de colesterol, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade (LDL), quando comparados aos indivíduos não infectados. Resultados semelhantes também foram encontrados por Bansal et al (2005), ao analisar os parâmetros lipídicos em indivíduos com

*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* e *G. lamblia*. Estes pesquisadores verificaram menores níveis de colesterol nos pacientes infectados, quando comparados com os controles.

Como um dos objetivos do trabalho foi avaliar o metabolismo de lipídeos decidiu-se avaliar o perfil de lipoproteínas circulantes, cujos componentes são: colesterol, triglicerídeos, fosfolipídeos e proteínas. Apesar das alterações séricas nos parâmetros proteínas totais ou albumina não terem sido observadas entre os grupos, a concentração de proteínas nas lipoproteínas foi significativamente alterada. Os grupos CTIn, DN e DNIn tiveram diminuição das concentrações protéicas em relação ao controle. A dieta hipoprotéica foi capaz de diminuir significativamente a concentração de proteínas nas frações nos grupos DN e DNIn, quando comparados ao CT.

Ao mesmo tempo, quando comparados os grupos CT e CTIn, é possível afirmar que a infecção por si, foi também capaz de modificar o perfil protéico. No entanto, ao correlacionar os grupos DN e DNIn, observa-se que a infecção não modificou a concentração protéica, uma vez que não houve diferença significativa entre estes dois grupos.

A análise da composição das lipoproteínas séricas também revelou uma queda significativa na concentração de colesterol pelo grupo DNIn em comparação com o grupo CT, indicando que não apenas a desnutrição, mas especialmente a infecção impactou de maneira acentuada os índices deste componente lipídico.

O estado de estresse oxidativo decorrente tanto da desnutrição quanto da infecção pode ter levado a maior oxidação de componentes das lipoproteínas no nosso modelo, alterando a composição das mesmas (Cartwright et al, 1982, El Harim et al, 1993, Feillet et al, 1993, Levy et al, 2000, Jahan-Mihan et al, 2011).

Além das alterações séricas, a desnutrição, pode levar a modificações em tecidos, como o fígado, por exemplo, ocasionando acúmulo de lipídeos no tecido hepático. O mecanismo pelo qual ocorre este acúmulo ainda não está completamente elucidado, porém sugere-se que possivelmente seja resultado de um aumento da disponibilidade de ácidos graxos para reesterificação hepática de triacilgliceróis e não da síntese prejudicada de  $\beta$ -lipoproteína, conforme proposto anteriormente (Badaloo et al, 2005). No entanto, neste estudo não foi possível demonstrar alteração na concentração de lipídeos hepáticos nos animais desnutridos. Este resultado pode ter sido decorrente do modelo animal utilizado, que não apresentou todas as alterações metabólicas conhecidas na desnutrição.

Os trofozoítos de *Giardia*, além de espoliar os nutrientes do hospedeiro, utilizam os sais biliares do indivíduo para seu crescimento, gerando uma solubilização insuficiente das gorduras e consequente diminuição na absorção de lipídeos. Com isso, a esteatorréia pode ser um dos sinais clínicos da doença. Outros estudos, como realizado por Chochillon *et al* (1986) investigando a excreção de gorduras nas fezes de adultos e crianças infectados com *G. lamblia*, já encontraram um aumento significativo deste composto nas fezes dos pacientes, especialmente nas crianças. Leitch *et al* (1993), observaram que animais submetidos a dieta hipoprotéica com infecção por *G. lamblia*, apresentaram maior excreção de gorduras nas fezes. Na presente pesquisa, foi possível demonstrar que os animais infectados por *G. lamblia* apresentaram maior excreção de colesterol que os animais desnutridos não infectados, sugerindo um efeito acentuado dessa solubilização insuficiente ocasionada pelo parasito.

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e a capacidade do sistema biológico em prontamente desintoxicar os intermediários reativos ou facilmente reparar o dano resultante dessa produção excessiva de ROS (Sies 1997). No entanto, 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).

Na desnutrição protéica ocorre aumento do estresse oxidativo, exemplificado pela exacerbação da oxidação protéica e da peroxidação lipídica, podendo-se inclusive, utilizar este último processo como marcador precoce da desnutrição (Manary *et al*, 2000, Jimoh *et al*, 2005). Ao mesmo tempo, a produção hepática de enzimas antioxidantes estaria diminuída, em decorrência da privação de proteínas (Ronchi *et al*, 2010).

Já em infecções por *G. lamblia*, o efeito que as ROS poderiam exercer na defesa contra os parasitos tem sido discutido, considerando-se que este protozoário possui capacidade limitada para desintoxicar e neutralizar as espécies reativas ao oxigênio (Brown *et al*, 1998, Roxström-Lindquist 2006, Mastronicola *et al*, 2011).

No presente estudo, os animais alimentados com dieta restrita em proteínas e infectados com *G. lamblia*, apresentaram um aumento significativo na atividade de catalase quando comparados aos animais do grupo controle. Corroborando com os achados deste trabalho, Sidhu *et al* (2004), ao avaliar o efeito protetor do zinco sobre o estresse oxidativo, encontraram aumento nos índices de catalase nos animais desnutridos. Akinola *et al* (2010) também demonstraram que animais submetidos a dieta hipoprotéica apresentaram aumento significativo da atividade de catalase, porém encontraram diminuição na atividade de SOD, o

que não foi observado no presente trabalho. Estudos avaliando o balanço entre estresse oxidativo e produção de antioxidante, em crianças infectadas com *G. lamblia*, realizado por Demirci *et al* (2003), demonstrou que a atividade da SOD eritrocitária foi significativamente menor nos pacientes infectados, assim como os níveis de malonaldeído (MDA) foram estatisticamente maiores nas crianças com giardíase em relação aos controles. Neste trabalho, a peroxidação lipídica, representada pelos níveis de MDA, no teste de TBARs, não demonstrou diferenças significativas.

A infecção sozinha não alterou a atividade da enzima catalase hepática. Estes resultados remetem a causa do estresse oxidativo à desnutrição. No entanto, a diferença significativa encontrada entre os grupos CT e DNIn sugerem que a lesão intestinal causada pela infecção com *Giardia* em animal desnutrido, possa ter exacerbado a produção de radicais livres e, conseqüentemente a atividade de enzimas antioxidantes.

Quanto às alterações histopatológicas, avaliamos inicialmente a área de muco nos animais em experimentação. Qualitativamente, os grupos DN, DNIn e CTIn produziram significativamente maior quantidade de muco comparados ao CT. Durante o processo infeccioso no intestino delgado, a secreção de mucina pelas células caliciformes no intestino delgado é rapidamente aumentada em resposta a microorganismos patogênicos (Moncada *et al*, 2003, Turner 2009). Contudo, informação sobre as barreiras físicas em desnutrição hipoprotéica é fragmentada, a despeito de seu papel primário na defesa contra infecções oportunistas. Especula-se que a desnutrição hipoprotéica alteraria a expressão dos receptores glicoprotéicos da membrana, modificando a quantidade de muco mantido nas superfícies epiteliais e a natureza química das lectinas presentes no mesmo, explicando o maior risco de infecções em desnutridos (Woodward 1998). Nossos resultados demonstraram maior produção de muco em animais desnutridos, porém os motivos deste aumento estão para ser investigados.

Nossos resultados também demonstraram maior produção de muco nos animais desnutridos infectados, sugerindo um sinergismo entre desnutrição e giardíase na tentativa de controlar a aderência da *Giardia* à mucosa. Contudo não foram observadas diferenças significativas entre o número de trofozoítos avaliado por imunohistoquímica em nenhum dos grupos experimentais, apesar da análise qualitativa ter demonstrado maior presença de parasitos imunomarcados nos animais do grupo desnutrido infectado.

Na giardíase, dados preliminares obtidos em gerbils evidenciaram que a secreção de muco aumentada reduziu a fixação epitelial dos trofozoítos de *G. lamblia*, diminuindo a intensidade da infecção (Leitch *et al*, 1989). Sugere-se que o aprisionamento destes agentes pelo muco e a sua subsequente remoção do intestino pelo peristaltismo seja responsável por influenciar a

intensidade da infecção (Walker & Owen, 1990). Roskens *et al* (2002) demonstraram que a mucina tem um efeito negativo direto sobre a fixação do parasito. Katayama *et al* (1997) propõem ainda que o muco poderia exercer um papel protetor contra a adesão de patógenos à mucosa, como na infecção contra *Giardia*. Isso porque, como a patogenia desenvolvida pela *Giardia* depende exclusivamente da sua adesão à mucosa intestinal, a camada de muco poderia proteger as células epiteliais, impedindo a *Giardia* de obter acesso imediato ao epitélio. Por outro lado, alguns pesquisadores (Zenian & Gillin, 1985, Gault et al, 1987) já propuseram o efeito benéfico que o muco pode acarretar no crescimento dos trofozoítos. Foi sugerido que o muco criaria um microambiente entre o epitélio e o lúmen, protegendo a *Giardia* da degradação por enzimas, pH e sais intestinais.

Com base nos resultados conflitantes, não é possível determinar quando as mucinas seriam fatores fisiológicos envolvidos na defesa do hospedeiro, contra a *Giardia* ou contribuiriam para a colonização deste parasito na superfície da mucosa.

A desnutrição pode levar à apoptose celular e diminuição na regeneração de enterócitos nas vilosidades, levando a diminuição tanto do número quanto na altura das mesmas (Shiner *et al*, 1973, Nichols *et al*, 2000, Pires *et al*, 2003). Comparando-se os grupos DNIn e CTIn observamos que a infecção no primeiro levou ao maior achatamento das vilosidades intestinais. Estes resultados mostram que a desnutrição impactou de forma determinante na diminuição das vilosidades nos animais infectados com *Giardia*. Assim sendo, nossos resultados sugerem contribuição da desnutrição na gravidade da giardíase, diminuindo a capacidade absorptiva intestinal via encurtamento das vilosidades.

É importante ressaltar que estudos utilizando gerbils como modelo experimental de desnutrição ou informações referentes a alterações nos parâmetros bioquímicos destes animais submetidos à giardíase são escassos. Sendo assim, estudos específicos avaliando o impacto da dieta hipoprotéica nestes animais são necessários para esclarecer tais modificações.

*Conclusões*

## 7. CONCLUSÕES

Com base no que foi analisado e discutido neste trabalho, é possível concluir que a giardíase modifica a resposta orgânica dos animais em dieta hipoprotéica, sendo capaz de proporcionar efeitos deletérios sobre o metabolismo dos animais e de acarretar alteração na estrutura das vilosidades.

Com base nas modificações observadas, mesmo que alterações em alguns parâmetros que eram esperadas não tenham ocorrido, pode-se afirmar que o sinergismo entre as duas doenças ocasionou piora de diversos outros parâmetros avaliados, sugerindo que esta associação foi impactante.

Entretanto, estudos posteriores, com outros modelos experimentais e outras cepas do parasito, deverão ser realizados, para esclarecer pontos ainda obscuros envolvendo desnutrição e giardíase.

## *Referências*

- 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.
- Abreu MAMM, Weckx LLM, Hirata CHW (2006). Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 72(4): 523-527.
- Acosta-Escribano J, Gomez-Tello V, Ruiz-Santana S (2005). Nutritional assessment of the severely ill patient. *Nutr Hosp*, 20(Suppl 2):5-8.
- Adam RD (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3):447–475.
- Aguilar-Díaz H, Carrero JC, Argüello-García R, Laclette JP, Morales-Montor J (2011). Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends in Parasitology*, 27(10): 450-458.
- Akinola FF, Oguntibeju OO, Alabi OO (2010). Effects of severe malnutrition on oxidative stress in Wistar rats. *Scientific Research and Essays*, 5(10): 1145-1149.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

Badaloo A, Reid M, Soares D, Forrester T, Jahoor F (2005). Relation between liver fat content and the rate of VLDL apolipoprotein B-100 synthesis in children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr*, 81(5):1126-1132.

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.

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.

Bayraktara 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.

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.
- Biolo G, Fleming RY, Maggi SP, Nguyen TT, Herndon DN, Wolfe RR (2002). Inverse regulation of protein turnover and amino acid transport in skeletal muscle of hypercatabolic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3378–3384.
- Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M, Mathers C, Rivera J (2008). Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*, 371: 243-260.
- Blakely T, Hales S, Woodward A (2004). Socioeconomic status: assessing the distribution of health risks by socioeconomic position at national and local levels. Geneva, World Health Organization - WHO Environmental Burden of Disease Series, 10.
- Blanchard R (1888). Remarques sur le megastome intestinal. *Bull Soc Zool Fr*, 13:18.
- Blössner M, de Onis M (2005). Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels. World Health Organization (WHO); Environmental Burden of Disease Series, 12.
- Bonnefoy M, Abidi H, Jauffret M, Garcia I, Draï J (2002). Hypocholesterolemia in hospitalized elderly: relations with inflammatory and nutritional status. *Rev Med Interne*, 23(12):991-8.
- Braamskamp MJ, Dolman KM, Tabbers MM (2010). Clinical practice. Protein-losing enteropathy in children. *Eur J Pediatr*, 169: 1179-1185.
- Brown DM, Upcroft JA, Edwards MR, Upcroft P (1998). Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Int. J. Parasitol*, 28:149–164.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 365:1147-1152.
- 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.

- 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.
- Cangiano C, Laviano A, Meguid MM, Conversano L, Preziosa I, Rossi-Fanelli F (1996). Effects of administration of oral branched-chain amino acids on anorexia and caloric intake in cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 88:550-552.
- 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.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010). Giardiasis Surveillance - United States, 2006–2008. *Surveillance Summaries, MMWR*, 59(SS-6).
- 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.

- Costarelli V & Emery PW (2009). The effect of protein malnutrition on the capacity for protein synthesis during wound healing. *The Journal of nutrition, Health & Aging*, 13(5): 409-412.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol*, 41:925-933.
- Dahl CA & Yamada T (2008). Global health inequity: scientific challenges remain but can be solved. *J Clin Invest*, 118:1242-1243.
- de Onis M, Blössner M, Borghi E, Frongillo E, Morris R (2004a). Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. *J American Medical Association*, 291:2600–2606.
- de Onis M, Blössner M, Borghi E, Morris R, Frongillo E (2004b). Methodology for estimating regional and global trends of child malnutrition. *Int J Epidemiol*, 33: 1260-1270.
- Delghingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, Amaral MEC, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM (2004) A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. *J Nutr* 134:321-327.
- 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.
- 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, Bieligg 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.
- Douglas J (2002) Eating problems in young children. *British Journal of Hospital Medicine* 63(3):140-143.
- Dubey R, Bavdekar SB, Muranjan M, Joshi A, Narayanan TS (2000). Intestinal giardiasis: an unusual cause for hypoproteinemia. *Indian J Gastroenterol* 19: 38-39.
- 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.
- El Harim I, Befori JJ, Balqfrej A, Lahrichi M, Girard-Globa A (1993). Lipids and lipoproteins of malnourished children during early renutrition: apolipoprotein A-IV as a potential index of recovery. *Am J Clin Nutr*, (58):407-11.
- Elia M, Stratton RJ (2000) How much undernutrition is there in hospitals? *Br J Nutr* 84:257-259.
- Emery PW (2005). Metabolic changes in malnutrition. *Eye*, 19: 1029–1034.
- Feillet F, Parra HJ, Kamian K, Bard JM, Fruchart JC, Vidailhet M (1993). Lipoprotein metabolism in marasmic children of Northern Mauritania. *Am J Clin Nutr*, (58):484-8.
- 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.
- Ferraris RP & Carey HV (2000). Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu. Rev Nutr*, 20:195–219.
- 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.
- Fossati P & Principe L (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, 28:2077–2080.

- 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.
- Gault MJ, Gillin FD & Zenian AJ (1987) Giardia lamblia: stimulation of growth by human intestinal mucus and epithelial cells in serumfree medium. Exp Parasitol 64(1):29-37.
- Gendrel D, Treluyer JM, Richard-Lenoble D (2003) Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. Fundam Clin Pharmacol 17:189-197.
- Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu Rev Microbiol, 50:679–705.
- Gomes MA, Oliveira DR, Freitas SE, Viana MP, Borges, EL. (2012) Effect of giardiasis combined with low-protein diet on intestinal absorption of glucose and electrolytes in gerbils. Experimental Parasitology 131: 448–451.
- 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.
- Guerrant RL, Oriá RB, Moore SR, Oriá MOB, Lima, AAM. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. Nutr Rev, 66(9):487-505.
- 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.
- Hawrelak J (2003). Giardiasis: Pathophysiology and Management. Altern Med Rev, 8(2):129-142.
- Herems C, Azevedo JF, Avaujo EJA, Sant’Ana DMG (2008). Intestinal ascending colon morphometrics in rats submitted to severe protein malnutrition. Intr J Morphol 26: 5-11.
- Herrera IA (2005). Giardiasis y desnutrición. Rev Soc Bol Ped, 44(3):166-173.
- 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.

Ihemelandu EC (1985). Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. *Acta Anat (Basel)*, 121:89-93.

Jahan-Mihan A, Luhovyy BL, El Khoury D, Anderson GH (2011). Dietary Proteins as Determinants of Metabolic and Physiologic Functions of the Gastrointestinal Tract. *Nutrients*, (3):574-603.

Jenkins MC, O'Brien CN, Murphy C, Schwarz R, Miska K, Rosenthal B, Trout JM (2009). Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent in vitro binding of *Giardia lamblia* trophozoites. *J Parasitol*, 95:895–899.

Jimenez 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.

Jimoh FO, Odutuga AA, Oladiji AT (2005). Status of Lipid peroxidation and Antioxidant enzymes in the Tissues of Rats Fed Low Protein Diet. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(6):431-434.

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.

Katayama M, Xu D, Specian RD, Deitch EA (1997) Role of Bacterial adherence and the Mucus Barrier on Bacterial Translocation Effects of Protein Malnutrition and Endotoxin in Rats. *Annals of Surgery* 225: 317-326.

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.

- 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.
- Koot BGP, ten Kate FJW, Juffrie M, Rosalina I, Taminiau 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Leitch GJ, Udezulu IA, Visvesvara GS (1993). Effects of protein malnutrition on experimental giardiasis in the *Mongolian Gerbil*. Scand J Gastroenterol, 28: 285-93.

- 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.
- 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.
- Logan S, Hildebrandt LA (2003). The use of prealbumin to enhance nutrition- intervention screening and monitoring of the malnourished patient. *Nutr Today*, 38:134-135.
- 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.
- Lunn PG (2000). The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59:147–154.
- 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.
- Malafaia G, Martins RF, Silva ME (2009) Avaliação dos efeitos, em curto prazo, da deficiência protéica nos parâmetros físicos e bioquímicos de camundongos Swiss. *Rev Saúde e Biol* 4(2): 21-33.
- Manary MJ, Leeuwenburgh C, Heinecke JW (2000). Increased oxidative stress in kwashiorkor. *J Pediatr*, 137:421-424.
- 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.
- 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.

Mello ED (2005). Recuperação do desnutrido. In: Ferreira JS. *Pediatria: diagnóstico e tratamento*. Porto Alegre: ArtMed; p.141-6, 2005.

Melo JF, Macedo EMC, Silva RPP, Viana MT, Silva WTF, Castro CMMB (2008). Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. *Rev Nutr Campinas*, 21(6): 683-694.

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.

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 Tolllike 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.

Muniz-Junqueira MI & Queiroz EFO (2002). Relationship between protein–energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(2):133-141.

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.

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.

- Nichols BL, Nichols VN, Putman M, Avery SE, Fraley JK, Quaroni A, Shiner M, Sterchi EE, Carrazza FR (2000) Contribution of villous atrophy to reduced intestinal maltase in infants with malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30:494-502.
- 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.
- 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).
- 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.
- Organização das Nações Unidas (ONU), 2003. Disponível em <http://www.un.org>. Acesso em: 22 set. 2012.
- 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.
- Parada-Simão TR, Oliveira F, Pacheco ME, Alves PHM, Liberti EA (2011). Effects of protein malnutrition on muscle fibers of the brachial biceps and medial pterygoid of Wistar rats. *J Morphol Sci*, 28(3): 196-203.

- Perampalli T, Swami SC, Kumbar KM, Suryakar AN, Shaikh AK (2010). Possible role of oxidative stress in malnourished children. *Curr Pediatr Res*, 14(1):19-23.
- Pereira MG, Atwill ER, Barbosa AP (2007). Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 49(3): 139-145.
- Pires ALG, Silveira TR, Silva VD (2003). Estudo morfológico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. *J Pediatr Rio J*, 79(4): 329-336.
- Piva B & Benchimol M (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell*, 96:735-746.
- Rice AL, Sacco L, Hyder A, Black RE (2000). Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 78:1207–1221.
- Ronchi VP, Giudici AM, Mendieta JR, Caballero VJ, Chisari AN, Sanllorenti PM, Conde RD (2010). Oxidative stress in mouse liver caused by dietary amino acid deprivation: protective effect of methionine. *J Physio Bioch*, 66(2): 93-103.
- 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.
- 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.
- Santos CK, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, Mundim MJ, Cury MC (2012). Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 106(8):473-479.
- Savioli L, Smith H, Thompson A (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends Parasitol*, 22: 203–208.

- 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, Yu LC, Buret AG (2004). Role of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*, 72: 3536–3542.
- Shelton AA (2004). Sexually Transmitted Parasitic Diseases. *Clinics in colon and rectal surgery*, 17: 231-234.
- Shiner M, Redmond AOB, Hansen JDL (1973) The jejunal mucosa in protein-energy malnutrition. A clinical, histological, and ultrastructural study. *Experimental and Molecular Pathology* 19:61-78.
- Shukla G & Sidhu RK (2011) Effect of *Giardia duodenalis* in protein malnourished and renourished mice. *Cent Eur J Med* 6(6): 762-769.
- Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK (2004). Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutr Hosp*, 19(6): 341-347.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82(2): 291-295.
- 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.
- Slifko TR, Smith HV, Rose JB (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol*, 30:1379– 1393.
- 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 (2011). Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J Immunol*, 187 (7): 3769-3775.

- Souza IP, Kang HC, Nardinelli L, Borelli P (2001). Desnutrição protéica: efeito sobre o espraiamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37(2).
- Stiles CW (1902). The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. *Zool Anz*, 25:689.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82(2): 291-295.
- 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.
- Syed A, Hill DR (2003). *Giardia intestinalis*. *Gastrointestinal Infections*, 1(16):453-460.
- 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.
- Thompson RCA (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.*, 30:1259–1267.
- 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.
- Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9:799-809.
- Umar SB, DiBaise JK (2010). Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review. *Am J Gastroenterol* 105: 43-49.
- Valadares CT, Fukuda MTH, Françolin-Silva AL, Hernandez AS, Almeida SS (2010). Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutritional Neuroscience*, 13(6):274-282.

- 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.
- Vituri CL, Alvarez-Silva M, Trentin AG, Borelli P (2008). Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides in vitro no modelo de desnutrição protéica em camundongos. *Braz J Pharma Sci*, 44(3): 493- 500.
- Walker RI & Owen RL (1990) Intestinal barriers to bacteria and their toxins. *Annual Review of Medicine* 41:393–400.
- Ward HD (2009). Intestinal protozoal parasites and diarrheal disease in Bangladesh. *Clin. Infect. Dis.*, 48:1198–1200.
- Wiest R & Ralsh HC (2003). Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(3):397-425.
- Williamson AL, O'Donoghue PJ, Upcroft JA, Upcroft P (2000). Immune and pathophysiological responses to diferente strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int. J. Parasitol.*, 30:129–136.
- 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.
- Wolfe MS (1992). Giardiasis. *Clin Microbiol. Rev*; 5(1): 93-100.
- Woodward B (1998) Protein, calories, and immune defences. *Nutrition Reviews* 56(1):S84-S92.
- World Health Organization (1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. *World Health Organization Technical Report Series*, 854.
- Yamada T. In search of new ideas for global health (2008). *N Engl J Med.*, 358:1324-1325.
- 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.

*“Sendo o fim doce, que importa que o começo amargo fosse?”*

William Shakespeare