

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA FELGUEIRA PAVANELLI

Histopatogenicidade de *Blastocystis* sp para camundongos Swiss

Maringá
2012

MARIANA FELGUEIRA PAVANELLI

Histopatogenicidade de *Blastocystis* sp para camundongos Swiss

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof.^a Dr.^a Mônica Lúcia Gomes

Maringá
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362**

P337h Pavanelli, Mariana Felgueira
Histopatogenicidade de Blastocystis SP para camundongos Swiss /
Mariana Felgueira Pavanelli.— Maringá, PR: UEM, 2012.
48 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Lúcia Gomes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá.
Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde do
Centro de Ciências da Saúde.
Bibliografia.

1. Blastocystis sp. 2. Patogenicidade. 3. Camundongos swiss. 4.
Subtipos moleculares. I. Gomes, Mônica Lúcia. II. Universidade Estadual
de Maringá. III. Título.

CDD 21.ed 571.6

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA FELGUEIRA PAVANELLI

Histopatogenicidade de *Blastocystis* sp para camundongos Swiss

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Mônica Lúcia Gomes
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Sueli Oliveira Silva Lautenschlager
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 12 de dezembro de 2012.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, à minha família e ao meu namorado, os quais contribuíram imensamente para a sua realização.

AGRADECIMENTO(S)

À Deus, sempre.

Aos meus pais, Mario Luiz Pavanelli e Márcia Felgueira Pavanelli e ao meu irmão, Mario Henrique Felgueira Pavanelli, pelo apoio, confiança, imenso amor e dedicação todos esses anos.

Ao meu namorado, Paulo Rafael, pelo incentivo, compreensão, carinho e por estar ao meu lado em todos os momentos importantes de minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Mônica Lúcia Gomes, pela paciência, dedicação, competência e por todo o conhecimento transmitido durante esses dois anos, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa, por quem tenho muita admiração e respeito.

Às amigas que conquistei nessa jornada, Sheila, Carla, Cristiane, Ana Paula Teston, Amanda, Lara, Tiara, Camila Brustolin e Camila Piva, pelo auxílio em meus experimentos e pelos inúmeros momentos de descontração, amizade e apoio.

Aos demais colegas das turmas 2010 e 2011 do mestrado em Ciências da Saúde.

À Fernanda Lago Spitzner, por ter me incentivado a realizar o mestrado e me apresentar à professora Mônica.

Aos técnicos do laboratório de Parasitologia: João, Elza, Izabel, Sandra e Silvana, pelo apoio e dedicação. Em especial à Betânia, por seus maravilhosos bolos de fubá e cafezinhos no meio da tarde.

Aos professores Denise Lessa Aleixo, Áurea Regina Telles Pupulin, Ana Lúcia Falavigna Guilherme, Silvana Marques de Araújo, Sueli de Oliveira Silva Lautenschlader, Edilson Nobuyoshi Kaneshima e Max Jean de Ornelas Toledo, pelos conhecimentos transmitidos e apoio.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho o meu sincero agradecimento.

EPÍGRAFE

“O conhecimento nos faz
responsáveis” (Che Guevara)

Histopatogenicidade de *Blastocystis* sp para camundongos Swiss

RESUMO

Blastocystis sp é um protozoário entérico com poucos estudos sobre o seu potencial patogênico em modelos experimentais. Neste trabalho a patogenicidade de *Blastocystis* sp no trato gastrointestinal de camundongos foi avaliada de acordo com o inóculo e tempo de infecção. Camundongos Swiss machos foram infectados, via intragástrica, com 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 formas císticas de *Blastocystis* sp obtidas a partir de uma mistura de oito isolados humanos cultivados em meio Jones. Após 7, 14, 21, 28 e 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e fragmentos do intestino delgado (duodeno), grosso e ceco foram retirados para análise histopatológica. Concomitantemente à infecção dos animais, as formas císticas dos isolados foram lavadas e purificadas para a extração de DNA. O gene de RNA ribossomal (SSU-rRNA) foi amplificado e os produtos foram digeridos com a enzima de restrição *AluI* para a análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP). *Blastocystis* sp desencadeou resposta inflamatória nos diferentes tecidos analisados, com predominância de infiltrado mononuclear. Foi observada uma predileção pelo ceco com caráter invasivo pelo encontro de cistos na túnica muscular. Inóculos maiores desencadearam processos inflamatórios mais precocemente (7 dias) e inóculos menores mais tardiamente (a partir de 21 dias). A análise molecular identificou os subtipos 1 e 3 que não puderam ser relacionados com a patogenicidade, pois os inóculos foram obtidos a partir de uma mistura de isolados. Conclui-se que no modelo proposto a patogenicidade dos isolados de *Blastocystis* sp aqui estudados tem relação com o inóculo e tempo de infecção.

Palavras-chave: *Blastocystis* sp. Patogenicidade. Camundongos swiss. Subtipos moleculares.

Pathogenicity of *Blastocystis sp* to Swiss mice

ABSTRACT

Blastocystis sp is an enteric protozoan with few studies about its pathogenic potential in experimental models. In this work the *Blastocystis sp* pathogenicity in gastrointestinal tract of mice was evaluated according to the inoculum and duration of infection. Male Swiss mice were infected intragastrically, with 100, 500, 1,000, 5,000 and 10,000 *Blastocystis sp* cystic forms which were obtained from a mixture of eight isolated human who were cultured in Jones medium. After 7, 14, 21, 28 and 60 days of infection, the animals were sacrificed and fragments of the small, large and cecum intestine were taken for histopathological analysis. Concomitantly to animals infection, the cystic forms of the isolated human were washed and purified for DNA extraction. The gene of ribosomal RNA (SSU-rRNA) was amplified and the products were digested with *AluI* restriction enzyme to analyze the restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Blastocystis sp* triggered inflammatory response in different tissues that were analyzed, predominantly mononuclear infiltrate. A predilection by the cecum intestine with invasive character was observed by finding cysts in the muscular layer. Greater inocula triggered earlier inflammatory processes (7 days) and smaller inocula, later (from 21 days). Molecular analysis identified subtypes 1 and 3 that could not be related to pathogenicity, because the inocula were obtained from a mixture of isolated. We conclude that in the proposed model the pathogenicity of *Blastocystis sp* isolates studied, is related to the inoculum and duration of infection.

Keywords: *Blastocystis sp*. Pathogenicity. Swiss mice. Molecular subtypes.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* (artigo) disponível em: <<http://www.scielo.br/revistas/rimtsp/pinstruc.htm>>.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	11
1.1	Taxonomia de <i>Blastocystis</i> sp: aspectos clássicos e moleculares	11
1.2	Aspectos da morfologia, biologia e epidemiologia de <i>Blastocystis</i> sp	11
1.3	Diagnóstico de <i>Blastocystis</i> sp: aspectos clássicos e moleculares	13
1.4	Manifestações clínicas e tratamento das infecções causadas por <i>Blastocystis</i> sp	15
1.5	Potencial Patogênico de <i>Blastocystis</i> sp: aspectos clássicos e moleculares	16
1.6	Justificativa	16
1.7	Objetivos	17
1.8	Referências	17
2	CAPÍTULO II	22
2.1	Artigo: Histopatogenicidade de <i>Blastocystis</i> sp para o trato gastrointestinal de camundongos: relação com inóculo e tempo de infecção	22
3	CAPÍTULO III	47
3.1	Conclusões	47
3.2	Perspectivas futuras	47

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1) Taxonomia de *Blastocystis* sp: aspectos clássicos e moleculares

Em 1912, Brumpt ao analisar amostras de fezes humanas identificou *Blastocystis* sp como um novo micro-organismo e o relacionou à *Blastomyces* sp, forma cística de uma levedura pertencente ao gênero *Schizosaccharomyces* (BRUMPT, 1912). Esta classificação não foi discutida por cerca de 50 anos, até que Zierdt sugeriu que *Blastocystis* sp fosse reclassificado como um protozoário parasito, classificação esta aceita atualmente (ZIERDT et al, 1967; ZIERDT, 1978).

Análises genéticas incluíram *Blastocystis* sp ao complexo grupo dos *Stramenopiles* (STENZEL e BOREHAM, 1996), sendo o único nesse grupo capaz de causar doença no homem. Casos de blastocistose, infecção por *Blastocystis* sp, são relatados na literatura desde 1916, tornando-se mais discutidos a partir da década de 90 (JONES et al, 2009).

A denominação *Blastocystis hominis* surgiu em função de esse parasito ter sido primeiramente encontrado no homem (MENOUNOS et al, 2008) e posteriormente, em outros animais, como répteis, aves e demais mamíferos (STENSVOLD et al, 2008). Recentemente, técnicas moleculares permitiram identificar diferentes linhagens desse parasito levando a um consenso de que *Blastocystis* sp é a terminologia mais adequada (STENSVOLD, 2007).

Apesar desse consenso e dos avanços com o uso de metodologias moleculares ainda existem dificuldades na classificação desse parasito (MACEDO et al, 2010). Dez diferentes subtipos (ST1 a 10) foram descritos, sendo ST3 o mais comumente encontrado em humanos (STENSVOLD et al, 2008). Em estudo realizado na Amazônia Brasileira foram isolados os subtipos ST1, 2 e 3 dos indivíduos de uma comunidade indígena (MALHEIROS et al., 2011).

2) Aspectos da morfologia, biologia e epidemiologia de *Blastocystis* sp

Blastocystis sp é um protozoário unicelular anaeróbio estrito frequentemente encontrado no trato intestinal de humanos e de outros mamíferos, além de aves, répteis, anfíbios e com menor frequência em insetos (SOHAIL e FISHER, 2005; TANIZAKI et al, 2005; JANARTHANAN et al, 2011; ZHANG et al, 2011).

Possui características pleomórficas, com quatro principais formas descritas na literatura: vacuolar, granular, amebóide e cística. Ainda existem relatos sobre as formas avacuolar e multivacuolar, fazendo com que variações apresentadas nas diferentes formas evolutivas sejam um desafio para os estudos acerca da biologia celular deste intrigante parasito (TAN, 2008).

A forma vacuolar, mais frequentemente encontrada nas fezes, é esférica, com um vacúolo central e seu tamanho pode variar de 2 a 200 μm . A forma granular, semelhante a anterior, é encontrada em culturas, apresenta grânulos no interior do citoplasma ou do vacúolo central. Já a forma amebóide, raramente relatada, possui aspecto contorcido com um ou dois grandes pseudópodes, também encontrada em culturas. E a forma cística, mais recentemente descrita, é bem pequena (2 a 5 μm), de formato oval ou esférico, normalmente não é visualizada em culturas e é considerada a forma de resistência do parasito (TAN, 2008; STENSVOLD et al, 2008).

Discussões também têm sido feitas a respeito do ciclo biológico de *Blastocystis* sp, acreditando-se que esse parasito possua diversas formas de reprodução (TAN, 2008). A mais aceita atualmente é a reprodução assexuada, por fusão binária (SOHAIL e FISHER, 2005). A forma cística é a responsável pela infecção dos diversos hospedeiros (TANIZAKI et al, 2005). Quando esta forma é ingerida ocorre o seu rompimento durante a passagem pelo intestino grosso, e desenvolve-se em forma vacuolar que é eliminada nas fezes. A ordem e a maneira como estes fenômenos ocorrem não estão completamente estabelecidos, mas sabe-se que a forma vacuolar, antes de ser eliminada, é responsável pelo surgimento das formas granular e amebóide (TAN, 2008; IRIKOV et al, 2009). Como as formas avacuolar e multivacuolar participam do ciclo biológico de *Blastocystis* sp ainda não está estabelecido (STENSVOLD et al, 2008).

A infecção por esse parasito ocorre pela via fecal-oral direta e indireta, por meio de alimentos e água contaminados (YOSHIKAWA et al, 2004). De acordo com Thompson e Smith (2011) *Blastocystis* sp circula entre animais e humanos apresentando um caráter zoonótico. Alguns fatores de risco para a infecção por esse parasito vêm sendo relatados como: consumo de água não tratada, manuseio de animais, trânsito intestinal diminuído, diabetes, imunossupressão, quimioterapia, infecção pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida) e Síndrome do Intestino Irritado (IBS) (SOHAIL e FISHER, 2005; TAN, 2008).

Blastocystis sp destaca-se por ser um dos protozoários parasitos intestinais que apresenta a maior taxa de prevalência (IGUCHI et al, 2007; HUSSEIN et al, 2008; MACEDO et al, 2010). Sua distribuição é mundial, com prevalências mais elevadas nos países em

desenvolvimento, principalmente aqueles das regiões tropicais e subtropicais (AMATO NETO et al, 2003; TAN, 2008; ELWAKIL e HEWEDI, 2010).

De acordo com Vogelberg et al. (2010) em países desenvolvidos a taxa de infecção por *Blastocystis* sp está entre 5 e 20% e naqueles em desenvolvimento, esta taxa ultrapassa 50%. Países como Japão e Singapura apresentam as menores taxas de prevalência, 0,5 a 1% e 3,3%, respectivamente, sendo que na Argentina, Brasil, Cuba, Egito e Indonésia estão as maiores taxas de prevalência, chegando a 60% na Indonésia (TAN, 2008).

No Brasil há registros desse parasito em diversos estados. Em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro foram relatadas prevalências de *Blastocystis* sp que variaram de 6,7% a 70%, sejam elas observadas entre pacientes hospitalizados (MACEDO et al, 2010) ou entre moradores de diversos bairros (SILVA, 2006; SILVA-NETO et al, 2010). No estado de São Paulo, nos municípios de Araraquara e São Paulo, foi observada uma positividade de 4,6% e 38,3%, respectivamente, destacando que o estudo na capital foi constituído somente por crianças (AMATO NETO et al, 2004; MINÉ e ROSA, 2008). Nos estados do Piauí e Mato Grosso do Sul estudos apontam prevalência de 3,4% e 40,9%, respectivamente (ALVES et al, 2003; AGUIAR et al, 2007). Inquéritos coproparasitológicos no estado do Paraná mostraram que das amostras analisadas em Pitanga, Campo Mourão e Cascavel a presença de *Blastocystis* sp foi detectada em 26,5%, 20,9% e 28,2%, respectivamente (NASCIMENTO e MOITINHO, 2005; KULIK et al, 2008; TAKIZAWA et al, 2009).

3) Diagnóstico de *Blastocystis* sp: aspectos clássicos e moleculares

O diagnóstico baseia-se principalmente nos métodos parasitológicos tradicionais: exame à fresco, concentração por sedimentação em água (HOFFMANN et al, 1934) e por formol-éter com ou sem adição de solução de lugol, nos quais o parasito é visualizado microscopicamente (PARKAR et al, 2007; MENOUNOS et al, 2008; STENSVOLD et al, 2008).

A detecção da forma cística é um desafio para muitos, já que estes podem se assemelhar a fungos ou detritos fecais. Outro fato que dificulta o diagnóstico é que as formas císticas, vacuolar e granular de *Blastocystis* sp, podem ser rompidas na presença de água destilada. Dessa forma, a utilização da técnica formol-éter favorece o diagnóstico, já que os líquidos conservantes preservam as diferentes formas do parasito (NASCIMENTO e MOITINHO, 2005; STENSVOLD et al, 2008).

O diagnóstico pode ainda ser facilitado pela confecção de esfregaços permanentes corados com tricromo, hematoxilina férrica, Giemsa, Gram e coloração de Wright (NASCIMENTO e MOITINHO, 2005). Alarcón et al (2007) encontraram 19,8% de positividade para *Blastocystis* sp com auxílio da coloração por hematoxilina férrica.

Uma estratégia amplamente utilizada é o cultivo do protozoário em meio Jones (JONES, 1946), o que aumenta a possibilidade de resultados positivos devido a proliferação celular do parasito (STENSVOLD et al, 2008). Zerpa et al. (2000) desenvolveram um meio de cultura para o crescimento de *Blastocystis* sp e compararam os resultados referentes ao diagnóstico em cultura e exame a fresco. *Blastocystis* sp foi encontrado em 70% das culturas, enquanto que a positividade para o exame a fresco foi de 21%. Suresh e Smith (2004) avaliaram 1000 amostras de fezes pelos métodos de concentração por formol-éter e cultivo em meio específico. Pelo cultivo 39 amostras foram positivas para *Blastocystis* sp, enquanto que pelo método de formol-éter o parasito não pode ser detectado.

O método de diagnóstico pode influenciar no desfecho clínico da blastocistose, na avaliação da eficácia terapêutica e na obtenção de dados epidemiológicos a respeito das infecções causadas por *Blastocystis* sp (STENSVOLD et al, 2008). Em estudos realizados em regiões próximas Horiki et al. (1997) e Yaicharoen et al. (2005) observaram prevalências muito distintas para *Blastocystis* sp dependendo do método utilizado para detecção do parasito. Pelo exame à fresco a prevalência foi de 0,5%, enquanto que pelo cultivo em meio específico a prevalência observada foi de 20,9%. Esses resultados indicam que para um diagnóstico preciso devem ser padronizadas técnicas que facilitem a busca e/ou visualização de *Blastocystis* sp (STENSVOLD et al, 2008).

Técnicas moleculares baseadas na análise da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA), *riboprinting* e polimorfismo de DNA amplificado randomicamente (RAPD) têm sido amplamente adotadas no diagnóstico de *Blastocystis* sp. Estas ferramentas, consideradas padrão ouro de detecção, permitem a identificação dos diferentes subtipos do parasito, já que estes são morfologicamente indistinguíveis (HUSSEIN et al, 2008; MENOUNOS et al, 2008; RIVERA et al, 2008; STENSVOLD et al, 2009).

4) Manifestações clínicas e tratamento das infecções causadas por *Blastocystis* sp

A blastocistose, infecção causada por *Blastocystis* sp, pode acometer crianças e adultos de todo o mundo (SOHAIL e FISHER, 2005; IGUCHI et al, 2007) que podem ou não

apresentar sintomas (HUSSEIN et al, 2008; STENSVOLD et al, 2008; VOGELBERG et al, 2010).

Dentre os sintomas mais clássicos pode-se citar: dor abdominal, prurido anal, flatulência, inchaço, anorexia, fadiga, náusea, vômito e diarreia de intensidade variável, sem presença de sangue ou leucócitos nas fezes (SOHAIL e FISHER, 2005; ELWAKIL e HEWEDI, 2010; VOGELBERG et al, 2010). Diarreia e cólica abdominal constituem os sintomas mais relatados pelos pacientes (TAN, 2008). Tais eventos podem durar de três a dez dias, ou persistir por semanas até anos se não tratados (AMATO NETO et al, 2003; STENSVOLD et al, 2010). Também podem ocorrer manifestações extra-intestinais, como artrite e desordens de pele, como urticária (VOGELBERG et al, 2010). De acordo com Sohail e Fisher (2005), pacientes portadores de cirrose hepática alcoólica ou hepatite B crônica apresentam maior risco de se infectar por *Blastocystis* sp, além de expressarem manifestações clínicas de maior intensidade.

As drogas preconizadas para o tratamento do portador da blastocistose com alívio ou erradicação dos sintomas são o metronidazol (250 a 750 mg três vezes ao dia até 1,5 mg/dia durante 10 dias), droga de primeira escolha, sulfametoxazol-trimetoprim, iodoquinol, rifaximina, paromomicina e nitazoxanida (STENSVOLD et al, 2008; TAN, 2008; STENSVOLD et al, 2009). Cimerman et al. (2003) obtiveram sucesso no tratamento da blastocistose com nitazoxanida em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Vogelberg et al. (2010) relataram que o tratamento com drogas isoladas (metronidazol 800mg/dia/10 dias; sulfametoxazol-trimetoprim 960mg/dia/1 semana e paromomicina 3g/dia) não foi bem sucedido em paciente com urticária persistente causada pela infecção por *Blastocystis* sp. A resolutividade do caso só foi conseguida pela associação de paromomicina 3g/dia com metronidazol 1,8g/dia durante 10 dias. Esses relatos juntamente com os de Moghaddam et al. (2005) que obtiveram eficácia terapêutica em apenas 33% dos pacientes tratados com metronidazol e 22% dos tratados com sulfametoxazol-trimetoprim apontam para o desenvolvimento de resistência de *Blastocystis* sp às terapias medicamentosas.

5) Potencial Patogênico de *Blastocystis* sp: aspectos clássicos e moleculares

A patogenicidade de *Blastocystis* sp é controversa, como sugerida por Macedo et al. (2010). Estudos clínicos e epidemiológicos o classificam como patogênico (DOMÍNGUEZ-

MÁRQUEZ et al, 2009) ou não patogênico (HUSSEIN et al, 2008), em função do surgimento ou não de sintomas (IGUCHI et al, 2007).

Hussein et al. (2008) estudaram o potencial patogênico de diferentes genótipos de *Blastocystis* sp, ao avaliar os subtipos 1, 2, 3 e 4. O ST1 demonstrou ser o mais patogênico, induzindo mortalidade em 25% dos animais, ST2 não apresentou alterações patológicas relevantes e ST3 e 4 foram observados em cepas patogênicas e não patogênicas. Esses autores relataram que *Blastocystis* sp produz cistina protease, a qual rompe os anticorpos do tipo IgA possibilitando a colonização do parasito no intestino humano. Stensvold et al. (2008) também defendem que a patogenicidade de *Blastocystis* sp varia de acordo com seu subtipo genético.

Além do subtipo, outros fatores podem influenciar na patogenicidade de *Blastocystis* sp. Tan e Suresh (2006) sugerem que a forma amebóide desse parasito representa um estágio patogênico. Stensvold et al. (2008) relataram que a patogenicidade de *Blastocystis* sp pode ser influenciada: pela quantidade de formas parasitárias, uma vez que quanto maior o número de parasitos maior a quantidade de mediadores inflamatórios liberados, exacerbando os efeitos teciduais da resposta inflamatória; pelas condições imunológicas do hospedeiro, já que indivíduos imunocomprometidos são quase que incapazes de exterminar o agente agressor, permitindo a sua proliferação; pelas variações genéticas do parasito, pois sabe-se que existem subtipos mais virulentos que outros; pelas terapia de intervenção e infecção concomitante de outros parasitos (ABBAS et al., 2010). Quando mais de um parasito está envolvido em uma infecção, as chances de surgirem manifestações intestinais crônicas, como retocolite hemorrágica, são maiores (MAAMOURI et al., 2011).

JUSTIFICATIVA

Diversos autores (SOHAIL e FISHER, 2005; STENSVOLD et al, 2008; TAN, 2008; VOGELBERG et al, 2010) relataram a escassez de investigações sobre muitas características de *Blastocystis* sp, especialmente acerca de sua taxonomia, diversidade genética e patogenicidade.

Casos assintomáticos de blastocistose, infecção causada por *Blastocystis* sp, conferiram caráter não patogênico ao parasito, porém sabe-se que esta inocuidade não está totalmente elucidada. Vários autores (IGUCHI et al, 2007; HUSSEIN et al, 2008) consideram esse protozoário como um oportunista já que frequentemente é diagnosticado em pacientes imunocomprometidos. Como pouca importância tem sido dada aos estudos relacionados ao potencial histopatológico deste intrigante protozoário, a investigação *in vivo* que comprove

seu potencial patogênico é relevante para a saúde pública, uma vez que portadores de blastocistose podem não estar sendo tratados e atendidos adequadamente pelos sistemas de saúde no Brasil.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a histopatogenicidade de *Blastocystis* sp no intestino de camundongos Swiss oralmente infectados

ESPECÍFICOS

Verificar a presença de formas parasitárias de *Blastocystis* sp e dos processos inflamatórios decorrentes desse parasitismo no trato intestinal dos camundongos oralmente infectados.

Relacionar a histopatogenicidade do parasito com os diferentes inóculos utilizados e com os períodos de infecção.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças.** 8º ed. São Paulo: Elsevier, 2010.

AGUIAR, J.I.A.; GONÇALVES, A.Q.; SODRÉ, F.C.; PEREIRA, S.R.; BÓIA, M.N.; LEMOS, E.R.S.de; DAHER, R.R. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, n.6, p.631-634, 2007.

ALARCÓN, R.S.R.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.; BEZERRA, R.C. Observações sobre *Blastocystis hominis* e *Cyclospora cayetanensis* em exames parasitológicos efetuados rotineiramente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, p.253-255, 2007.

ALVES, J.R.; MACEDO, H.W.; RAMOS JR, A.N.; FERREIRA, L.F.; GONÇALVES, M.L.C.; ARAÚJO, A. Parasitoses intestinais em região semi-árida do Nordeste do Brasil: resultados preliminares distintos das prevalências esperadas. **Cad. Saúde Pública.**, v.19, n.2, p.667-670, 2003.

AMATO NETO, V.; ALARCÓN, R.S.R.; GAKIYA, E.; BEZERRA, R.C.; FERREIRA, C.S.; BRAZ, L.M.A. Blastocistose: controvérsias e indefinições. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, p.515-517, 2003.

AMATO NETO, V.; ALARCÓN, R.S.R.; GAKIYA, E.; FERREIRA, C.S.; BEZERRA, R.C.; SANTOS, A.L.dos. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n.4, p.354-356, 2004.

BRUMPT, E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 5, p. 725-730, 1912.

CIMERMAN, S.; LADEIRA, M.C.T.; IULIANO, W.A. Blastocistose: nitazoxanida como nova opção terapêutica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, p.415-417, 2003.

DOMÍNGUEZ-MARQUES, M.V. GUNA, R. MUÑOZ, C. GÓMEZ-MUÑOZ, M.T. BORRÁS, R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). **Parasitol. Res.**, v.105, p.949-955, 2009.

ELWAKIL, H.S.; HEWEDI, I.H.; Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. **Parasitol. Res.**, v.107, p.685-689, 2010.

HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico J Public Health Trop Méd.**, v.9, p.283-291, 1934.

HORIKI, N.; MARUYAMA, M.; FUJITA, Y.; YONEKURA, T.; MINATO, S.; KANEDA, Y. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.56, p.370-374, 1997.

HUSSEIN, E.M.; HUSSEIN, A.M.; EIDA, M.M.; ATWA, M.M. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. **Parasitol. Res.**, v.102, p.853-860, 2008.

IGUCHI, A.; EBISU, A.; NAGATA, S.; SAITOU, Y.; YOSHIKAWA, H.; IWATANI, S.; KIMATA, I. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. **Parasitol. Int.**, v.56, p.107-112, 2007.

IRIKOV, O.A.; ANTOKHIN, A.I.; ROMANOV, Y.A. Study of the Dynamics of *Blastocystis Hominis* Reproduction *In Vitro*. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v.148, p.99-102, 2009.

JANARTHANAN, S.; KHOURY, N.; ANTAKI, F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. **Endoscopy.**, v.43, p.185-186, 2011.

JONES, M.S.; WHIPPS, C.M.; GANAC, R.D.; HUDSON, N.R.; BOROOM, K. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. **Parasitol. Res.**, v.104, p.341-345, 2009.

JONES, W.R. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*: with a method for evaluation the anti-amoebic properties of new compounds. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.40, p.128-140, 1946.

KULIK, R.S.; FALAVIGNA, D.L.M.; NISHI, L.; ARAÚJO, S.M. *Blastocystis* sp. and Other Intestinal Parasites in Hemodialysis Patients. **Braz J Infect Dis.** v.12, n.4, p.338-341, 2008.

MAAMOURI, N.; AYED, S.B.; AOUN, K.; MAMI, N.B.; BOURATBINE, A. Prévalence et type des parasitoses associées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. **Rev Med Interne.** v.325, p.S313-S434, 2011.

MACEDO, H.W.de.; GONÇALVES, A.M.H.; ALMEIDA, C.B.de.; DIAS, L.V.B.; MUNIZ, M.F. Infecção por *Blastocystis hominis* e *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* em pacientes atendidos em um hospital localizado em Niterói, Rio de Janeiro. **Rev. Pat. Trop.,** v.39, p.56-62, 2010.

MALHEIROS, A.F.; STENSVOLD, C.R.; CLARK, C.G.; Molecular Characterization of *Blastocystis* Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v.85, p.1050-1053, 2011.

MENOUNOS, P.G.; SPANAKOS, G.; TEGOS, N.; VASSALOS, C.M.; PAPADOPOULOU, C.; VAKALIS, N.C. Direct detection of *Blastocystis* sp. in human faecal samples and subtype assignment using strand conformational polymorphism and sequencing. **Mol. Cell. Probes.,** v.22, p.24-29, 2008.

MINÉ, J.C.; ROSA, J.A.da. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v.41, n.6, p.565-569, 2008.

MOGHADDAM, D.D.; GHADIRIAN, E. AZAMI, M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. **Parasitol. Res.,** v.96, p.273-275, 2005.

NASCIMENTO, S.A.; MOITINHO, M.L.B. *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná State, Brasil. **Rev. Inst. Med. S. Paulo.,** v.47, n.4, p.213-217, 2005.

PARKAR, U.; TRAUB, R.J.; KUMAR, S.; MUNGTHIN, M.; VITALI, S.; LEELAYOOVA, S.; MORRIS, K.; THOMPSON, R.C.A. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. **Parasitology.,** v.134, p.359-367, 2007.

RIVERA, W.L. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from animal and human hosts in the Philippines. **Vet. Par.,** v.156, p.178-182, 2008.

SILVA, A.A.da. Incidência de *Blastocystis hominis* na População da Cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Newslab.,** edição 75, p.86-96, 2006.

SILVA-NETO, L.M.da; OLIVEIRA, R.V.C.de; LAGAGGIO, V.; CAMILLO-COURA, L.; ZANINI, G.M. Ocorrência de *Blastocystis hominis* e outros parasitos intestinais em uma comunidade de Paracambi-RJ no período de abril a julho de 2005. **Rev. Pat. Trop.,** v.39, n.2, p.105-113, 2010.

SOHAIL, M.R.; FISCHER, P.R. *Blastocystis hominis* and travelers. **Trav. Med. Infect. Dis.,** v.3, p.33-38, 2005.

- STENSVOLD, C.R.; LEWIS, H.C.; HAMMERUM, A.M.; PORSBO, L.J.; NIELSEN, S.S.; OLSEN, K.E.P.; ARENDRUP, M.C.; NIELSEN, H.V.; MOLBAK, K. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. **Epidemiol. Infect.**, v.137, p.1655-1663, 2009.
- STENSVOLD, C.R.; SMITH, H.V.; NAGEL, R.F.; OLSEN, K.E.P.; TRAUB, R.J. Eradication of *Blastocystis* Carriage With Antimicrobials: Reality or Delusion? **J. Clin. Gastroenterol.** v.44, p.85-90, 2010.
- STENSVOLD, C.R.; SURESH, G.K.; TAN, K.S.; THOMPSON, R.C.; TRAUB, R.J.; VISCOGLIOSI, E.; YOSHIKAWA, H.; CLARK, C.G. Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 93-96, 2007.
- STENSVOLD, C.R.; NIELSEN, H.V.; MOLBAK, K.; SMITH, H.V. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. **Trends Parasitol.**, v.25, p.23-39, 2008.
- STENZEL, D.J.; BOREHAM, P.F.L. *Blastocystis hominis* revisited. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, n.4, p.563-584, 1996.
- SURESH, K.; SMITH, H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.509-511, 2004.
- TAKIZAWA, M.G.M.H.; FALAVIGNA, D.L.M.; GOMES, M.L. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Paraná, Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. S. Paulo.**, v.51, p.31-35, 2009.
- TAN, K.S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.21, p.639-665, 2008.
- TAN, T.C.; SURESH, K.G.; Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. **Parasitol. Res.**, v.99, p. 737-742, 2006.
- TANIZAKI, A.; YOSHIKAWA, H.; IWATANI, I.; KIMATA, I. Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. **Parasitol. Res.**, v.96, p.57-61, 2005.
- THOMPSON, R.C.A.; SMITH, A. Zoonotic enteric protozoa. **Vet. Par.**, v.182, p.70-78, 2011.
- VOGELBERG, C.; STENSVOLD, C.R.; MONECKE, S.; DITZEN, A.; STOPSACK, K.; HEINRICH-GRÄFE, U.; PÖHLMANN, C. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. **Parasitol. Int.**, v.59, p.469-471, 2010.
- YAICHAROEN, R.; SRIPOCHANG, S.; SERMSART, B.; PIDETCHA, P. Prevalence of *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals from Bangkok, Thailand. **J. Trop. Med. Public Health**, v.36, p.17-20, 2005.
- YOSHIKAWA, H.; YOSHIDA, K.; NAKAJIMA, A.; YAMANARI, K.; IWATANI, S.; KIMATA, I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. **Parasitol. Res.**, v.94, p.391-396, 2004.

ZERPA, R.L.; HUICHO, L.; NÁQUIRA, C.; ESPINOZA, I. A simplified cultura method for *Blastocystis hominis*. **Revista Mexicana de Patología Clínica.**, v.47, n.1, p.17-19, 2000.

ZHANG, X.; QIAO, J.; WU, X.; DA, R. ; ZHAO, L.; WEI, Z. In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. **Int. J. Infect. Dis.**, p.1-6, 2011.

ZIERDT, C.H. *Blastocystis hominis*, an intestinal protozoan parasite of man. **Public Health Lab**, v. 36, p. 147-160, 1978.

ZIERDT, C.H.; RUDE, W.S.; BULL, B.S. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 48, p. 495-501, 1967.

CAPÍTULO II

Artigo: “Histopatogenicidade de *Blastocystis* sp para o trato gastrointestinal de camundongos: relação com inóculo e tempo de infecção”

**Histopatogenicidade de *Blastocystis* sp para o trato gastrointestinal de camundongos:
relação com inóculo e tempo de infecção**

Mariana F. Pavanelli¹, Mônica L. Gomes¹

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, PR

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá, Departamento de
Ciências Básicas da Saúde (DBS) – Av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná,
Brasil

RESUMO

Poucos estudos abordam o potencial patogênico de *Blastocystis* sp em modelos experimentais. Neste trabalho a patogenicidade de *Blastocystis* sp no trato gastrointestinal de camundongos foi avaliada de acordo com o inóculo e tempo de infecção. Camundongos Swiss machos foram infectados, via intragástrica, com 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 cistos de *Blastocystis* sp obtidos a partir de uma mistura de oito isolados humanos cultivados em meio Jones. Após 7, 14, 21, 28 e 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e fragmentos do intestino delgado (duodeno), grosso e ceco foram retirados para análise histopatológica. Concomitantemente à infecção dos animais, foi realizada a tipagem molecular pela análise do gene de RNA ribossomal (SSU-rRNA). *Blastocystis* sp desencadeou resposta inflamatória nos diferentes tecidos analisados, com predominância de infiltrado mononuclear, principalmente no ceco onde teve ~~em~~ caráter invasivo pelo encontro de cistos na túnica muscular. Inóculos maiores desencadearam processos inflamatórios mais precocemente (7 dias) e inóculos

menores mais tardiamente (a partir de 21 dias). A análise molecular identificou os subtipos 1 e 3 que não puderam ser relacionados com a patogenicidade. Conclui-se que no modelo proposto a patogenicidade dos isolados de *Blastocystis* sp estudados tem relação com o inóculo e tempo de infecção.

Palavras-chave: *Blastocystis* sp; Patogenicidade; Subtipos moleculares; Camundongos Swiss.

SUMMARY

Few studies approaches the pathogenic potential of *Blastocystis* sp in experimental models. In this work the *Blastocystis* sp pathogenicity in gastrointestinal tract of mice was evaluated according to the inoculum and duration of infection. Male Swiss mice were infected intragastrically, with 100, 500, 1,000, 5,000 and 10,000 *Blastocystis* sp cystic forms which were obtained from a mixture of eight human isolates and were cultured in Jones medium. After 7, 14, 21, 28 and 60 days of infection, the animals were sacrificed and fragments of the small, large and cecum intestine were taken for histopathological analysis. Concomitantly to animals infection, was performed molecular typing by analysis of the gene of ribosomal RNA (SSU-rRNA). *Blastocystis* sp triggered inflammatory response in different tissues that were analyzed, predominantly mononuclear infiltrate. A predilection by the cecum intestine with invasive character was observed by finding of cysts in the muscular layer. Greater inocula triggered earlier inflammatory processes (7 days) and smaller inocula, later (from 21 days). Molecular analysis identified subtypes 1 and 3 that could not be related to pathogenicity. We conclude that in the proposed model the pathogenicity of *Blastocystis* sp isolates studied, is related to the inoculum and duration of infection.

Keywords: *Blastocystis* sp; Pathogenicity; Molecular subtypes; Swiss mice.

INTRODUÇÃO

Blastocystis sp, agente causal da blastocistose, apresenta um dos maiores percentuais a dentre os protozoários parasitos intestinais que infectam os humanos ^{8,9,16}. Sua distribuição é mundial, com prevalências superiores à 50% nos países em desenvolvimento, principalmente aqueles das regiões tropical e subtropical ^{2,6,21}. Este dado está relacionado às condições de higiene precárias, contato com animais domésticos, superlotação, consumo de água e alimentos contaminados, falta de saneamento básico e de remoção de resíduos ^{18,21}.

A blastocistose pode acometer tanto crianças como adultos e vários autores ^{2,5,6,18,19,24} consideram *Blastocystis* sp como um ~~real~~ patógeno, ao contrário de outros ^{8,9} que o consideram não patogênico. O caráter inócuo desse parasito lhe foi atribuído diante da ocorrência de muitos casos de blastocistose assintomática ⁹. Entretanto, síndromes secundárias, como a urticária, têm sido relatadas em decorrência da presença desse protozoário ²⁴.

Sabe-se que a patogenicidade de *Blastocystis* sp pode estar relacionada ao seu subtipo (ST) genético. Até o momento, dez subtipos de *Blastocystis* sp já foram identificados, sendo que no Brasil foram descritos o ST1, 2 e 3 ¹⁷. Além dos subtipos, outros fatores podem influenciar na patogenicidade desse parasito. TAN & SURESH (2006)²² sugerem que a forma amebóide de *Blastocystis* sp representa um estágio patogênico. Segundo STENSVOLD *et al.* (2008)²⁰ são requisitos que influenciam na patogenicidade de *Blastocystis* sp: quantidade de formas parasitárias, uma vez que quanto maior o número de micro-organismos maior a quantidade de mediadores inflamatórios liberados, exacerbando os efeitos teciduais da resposta inflamatória; condições imunológicas do hospedeiro, já que indivíduos imunocomprometidos são quase incapazes de exterminar o agente agressor, permitindo a sua proliferação; terapia de intervenção e infecção concomitante de outros parasitos ¹. Quando

mais de um protozoário está envolvido em uma infecção, as chances de surgirem manifestações intestinais crônicas, como retocolite hemorrágica, são maiores¹⁵.

Em diversos modelos animais, a infectividade das formas císticas, alterações histopatológicas provocadas por *Blastocystis* sp e predileção tecidual foram investigadas^{6,23,26}. No entanto, estudos que abordem a histopatogenicidade de *Blastocystis* sp frente a diferentes inóculos e períodos de infecção em modelo murino não têm sido relatados na literatura. Diante de tal questão, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento histopatológico de *Blastocystis* sp no trato intestinal de camundongos Swiss oralmente infectados, bem como relacioná-lo à diferentes inóculos e períodos de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Os cistos de *Blastocystis* sp utilizados neste estudo foram obtidos de amostras de fezes de pacientes da região noroeste do Paraná triados no Laboratório de Parasitologia Ambiental e de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (LPAA/UEM), utilizando a técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ)⁷ modificada com solução salina 0,85%.

Oito amostras positivas para *Blastocystis* sp foram semeadas em meio Jones¹⁶ e as culturas foram mantidas a 37°C em condições de anaerobiose, agitadas diariamente conforme o trabalho de IRIKOV *et al.* (2009)¹². Após 72h as culturas foram examinadas em objetiva de 40X para confirmação de crescimento e então foram utilizadas para confecção do inóculo.

Para concentração das formas parasitárias as culturas foram centrifugadas à 2500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi resuspenso em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. Para obtenção de um grande número de cistos e padronização dos inóculos dos diferentes grupos experimentais, as oito amostras foram misturadas, os cistos

foram contados em Câmara de Neubauer e os inóculos de 10.000, 5.000, 1.000, 500 e 100 foram estabelecidos.

Manutenção, infecção e sacrifício dos animais

Este estudo, de caráter exploratório, utilizou trinta camundongos Swiss machos de 21 dias de idade foram distribuídos em seis grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e CN - Controle Negativo) de experimentação contendo 5 animais cada um. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia/UEM em caixas de polipropileno (dimensão 414x344x168mm) tampadas com grade zincada com depressão central para deposição da ração (comercial) e garrafa de água (clorada), as quais estavam à vontade dos animais. Tais caixas permaneceram em ambiente climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas.

Previamente à infecção dos animais o exame parasitológico de fezes foi realizado pela técnica de HPJ ⁷ para confirmar a ausência de parasitos entéricos.

Os animais dos grupos G1 ao G5 foram infectados com 10.000, 5.000, 1.000, 500 e 100 cistos, respectivamente. O grupo controle negativo (CN) recebeu somente solução salina em volume correspondente ao dos grupos desafiados e foi mantido nas mesmas condições. Os animais foram infectados por via intragástrica, com auxílio de uma cânula de gavage.

Dois dias após as infecções, os animais foram avaliados parasitologicamente, por meio da técnica de HPJ ⁷, para confirmar a presença do parasito. Os animais negativos foram examinados a cada dois dias até que se confirmasse a infecção.

Durante 4 semanas, a contar da data da infecção, um animal de cada grupo foi eutanaziado por semana perfazendo um total de 20 animais. Os cinco animais restantes foram sacrificados no 60º. dia da infecção. No dia do sacrifício os exames parasitológicos de fezes dos animais mostraram resultados positivos para *Blastocystis* sp e fragmentos do intestino

delgado (duodeno), ceco e intestino grosso (colon proximal) foram coletados para a realização da análise histopatológica de acordo com HUSSEIN *et al.* (2008)⁸.

Obtenção dos cortes histológicos dos tecidos

Os fragmentos de tecidos foram cortados longitudinalmente e lavados em solução salina 0,85%. Em seguida foram fixados, abertos, em solução de formalina 10% e conservados em álcool 70%. Após fixação as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Para estes processos as peças foram imersas em soluções alcoólicas de percentuais crescentes (80%, 90% e 100%), em seguida em uma solução 1:1 de xilol e álcool absoluto e por fim, em xilol (as peças ficaram imersas por um período de 10 a 20 minutos).

Após a inclusão em parafina foram realizados cortes de 5 µm de espessura, separados por intervalos de 20 µm (cortes semi-seriados). As lâminas confeccionadas foram coradas por hematoxilina-eosina e tiveram as lamínulas fixadas com solução de Permount®.

Análise histopatológica

As preparações microscópicas foram analisadas com a objetiva de 40X e quando necessário com a objetiva de 100X. A leitura foi realizada em duplicata (cortes A e B) e cada corte se distanciava do próximo 40µm. Toda a circunferência intestinal foi examinada e a presença do parasito e/ou de reações inflamatórias foi determinada, sendo esta última considerada quando da visualização de infiltrado inflamatório.

A intensidade dos processos inflamatórios foi classificada em discreta, moderada e intensa, de acordo com a ISO 10993-3 (1992)¹¹: Discreto – pequena quantidade de polimorfonucleares ou mononucleares, e as características histológicas do tecido estavam ainda identificáveis; Moderado - quantidade intermediária de células inflamatórias (sem

ocupar todo o campo de visualização), mas sem tecido necrótico, podendo haver desarranjo das características histológicas do tecido.

Extração de DNA

O sedimento obtido após centrifugação das culturas de *Blastocystis* sp foi lavado duas vezes em PBS pela centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, o DNA foi extraído com o kit *PuriLink™ PCR Purification* (Invitrogen – USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Amplificação da subunidade menor do gene RNA ribossomal (SSU-rRNA)

Para a amplificação da subunidade menor dos genes de RNA ribossomal (SSU-rRNA) foram utilizados os iniciadores RD3 (GGGATCCTGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC) e RD5 (GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTA) que geram um fragmento de 2.500 pares de bases ^{4,5}.

O volume final da reação foi de 11µl contendo 200µM de DNTP's, 50 picomoles de cada iniciador (RD3 e RD5), 2,5mM de MgCl₂, 0,5 U de *Taq Platinum* (Invitrogen), 1µl de tampão da enzima 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM KCl), água miliQ e 2µl de DNA total.

As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 30 ciclos de amplificação de 1 min a 93°C, 1,5 min a 65°C e 2 min a 72°C. Extensão final (72°C) por 10 min ⁴.

Deteção dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 5% pela revelação com sais de prata e digitalmente documentados.

Análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP)

Os produtos previamente amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *AluI*, a qual proporciona o surgimento de fragmentos com tamanhos relativos entre 38 e 850 pares de base (pb).

Para realização do corte enzimático uma solução aquosa de 12 µl foi preparada contendo 10 µl do produto amplificado, 1 µl da enzima de restrição (*AluI*) e 1 µl de tampão TBE 10X. A solução foi incubada a 37°C por 16 horas. Os produtos digeridos foram analisados em gel de poliacrilamida a 5%, revelados com sais de prata e digitalmente documentados. Os perfis obtidos das amostras isoladas foram comparados entre si e com amostras padrões descritas na literatura ⁴ a fim de se analisar os subtipos de *Blastocystis* sp.

Análise Estatística

A comparação dos resultados obtidos foi realizada pelo Teste Z utilizando o *software* Statistica versão 8.0 e para amostras independentes foi realizado o teste T de Student utilizando o *software Microsoft Excel 2007*. Para a apresentação dos principais achados histopatológicos foi realizada uma análise estatística descritiva utilizando o *software Microsoft Excel 2007*.

Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá sob o parecer nº 081/2011 (Anexo I).

RESULTADOS

Infectividade dos cistos de *Blastocystis* sp para camundongos Swiss

Os diferentes inóculos propostos (100 a 10.000) foram suficientes para desenvolver a infecção nos animais. A partir do segundo dia de infecção em 60% (15/25) dos animais foram observadas formas vacuolares do parasito, diferentes daquelas administradas por via intragástrica, indicando desenvolvimento do parasito na mucosa do hospedeiro. Em 40% (10/25) dos animais que ainda apresentavam exames parasitológicos negativos e que foram monitorados a cada dois dias, a infecção foi confirmada até o sétimo dia após a administração das formas císticas.

Predileção tecidual de *Blastocystis* sp

A Tabela 1 mostra a distribuição das formas vacuolares de *Blastocystis* sp encontradas no intestino delgado (duodeno), ceco e intestino grosso (cólon proximal) dos camundongos oralmente infectados. Quando a proporção de parasitos observada em cada porção do trato gastrointestinal foi comparada (Teste Z), nenhuma diferença significativa ($p=0,0608$ e $p=0,1889$) foi observada, porém pode-se notar uma nítida predileção do parasito pelo ceco. No que se refere ao estado de fixação do parasito no intestino, este foi encontrado na mucosa, submucosa e invadindo a túnica muscular do intestino grosso (Figura 1). Nessa figura pode ser observada parte de um agregado linfóide hiperplásico, uma forma vacuolar de *Blastocystis* sp na túnica muscular, com grânulos periféricos e um vacúolo central.

Relação da histopatogenicidade com inóculo e período de infecção

A Tabela 2 mostra que a quantidade de formas vacuolares implantadas no trato intestinal dos camundongos oralmente infectados não sofre influência do inóculo, mas sim do período de infecção. O teste T de Student mostrou que a comparação de médias entre a

quantidade de formas vacuolares encontradas no 7º dia de infecção (10) e no 60º dia de infecção (zero) foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). No período entre 14 e 28 dias o número de formas encontradas variou de 3 a 8, sem diferenças significativas.

Os grupos infectados com 10.000 (G1) e 100 (G5) cistos apresentaram processos inflamatórios teciduais em todos os períodos de infecção, mas no grupo G1 esses processos foram em maior número (10) do que em G5(7) (Tabela 3). A diferença entre esses dois grupos não foi significativa ($p = 0,1954$), mas os resultados indicam que o inóculo interferiu na resposta inflamatória e no curso da infecção. Nos grupos infectados com os demais inóculos (G2 a G4), os processos inflamatórios variaram de 4 a 8 e foram mais pronunciados tardiamente (entre 21 e 60 dias após a infecção). O período da infecção mostrou não influenciar na resposta inflamatória.

Quanto ao tipo de processo inflamatório observado, apenas no 60º dia de infecção estes foram do tipo focal. A Figura 2 mostra migração leucocitária com predomínio de leucócitos mononucleados e a presença de neutrófilos e eosinófilos dentre os polimorfonucleares. Ainda foram observados vasos com hiperemia e tecidos linfóides hiperplásicos, alterações responsivas à infecção parasitária. Os sinais de processo inflamatório somente foram visualizados nos cortes onde as formas vacuolares de *Blastocystis* sp estavam implantadas e as principais alterações foram encontradas nos cortes de intestino grosso e ceco, locais de predominância de formas vacuolares desse parasito.

A análise isolada dos diferentes órgãos mostrou que no duodeno os processos inflamatórios apenas foram observados aos 21 dias de infecção. No cólon proximal do intestino grosso os sinais discretos a moderados da inflamação foram registrados em todos os períodos da infecção, destacando que somente neste órgão foi encontrada forma vacuolar de *Blastocystis* sp implantada na túnica muscular. No ceco processos inflamatórios foram observados a partir de 21 dias da infecção.

A Tabela 4 mostra que a quantidade de tecidos linfóides hiperplásicos sofreu influência tanto do inóculo quanto do tempo de infecção. Nos grupos G1 e G2 (inóculos maiores) 100% dos agregados linfóides estavam hiperplásicos e os processos inflamatórios ocorreram mais precocemente (7 e 14 dias). Nos grupos G3, G4 e G5 (inóculos menores) 33,3 a 100% dos tecidos linfóides estavam hiperplásicos com os processos inflamatórios ocorrendo mais tardiamente (a partir do 14º dia de infecção), tendo uma maior frequência entre 21 e 28 dias. Destaca-se que no período de 14º dia somente um animal apresentou 100% dos tecidos linfóides hiperplásicos e no 60º dia poucos sinais de inflamação foram encontrados.

Subtipos moleculares de *Blastocystis* sp inoculados em camundongos Swiss

A análise do gene SSU-rRNA pela técnica do PCR-RFLP mostrou a presença de fragmentos de 38, 120, 164, 222, 267, 352, 370, 391, 450 e 850 pb. A comparação desses perfis com aqueles observados na literatura ⁴ mostrou serem esses padrões pertencentes aos subtipos 1 e 3 de *Blastocystis* sp.

DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi observado que a patogenicidade de *Blastocystis* sp para camundongos Swiss tem relação com inóculo e período de infecção. A quantidade de processos inflamatórios foi maior em animais infectados com o maior inóculo (10.000) ocorrendo em todos os períodos de infecção. Para inóculos menores os processos inflamatórios ocorreram em menor número e mais tardiamente. Além disso, os períodos de infecção avaliados interferiram na quantidade de formas vacuolares implantadas no tecido e no percentual de tecidos linfóides hiperplásicos. Este é o primeiro relato que mostra a relação entre inóculo e tempo de infecção e a patogenicidade de *Blastocystis* sp em camundongos.

Diversos autores que induziram blastocistose em outros modelos animais se restringiram a descrever as alterações histopatológicas, locais de predileção tecidual e as reações inflamatórias sem relacionar os seus achados com as duas variáveis avaliadas neste estudo ^{6,8,9,23,25,27}.

A quantidade de formas parasitárias inoculadas no animal interfere no grau da reação inflamatória gerada, pois a quantidade de mediadores inflamatórios liberados é diretamente proporcional à quantidade de micro-organismos presentes no hospedeiro. Tais mediadores da inflamação são responsáveis por alguns dos efeitos observados nos tecidos avaliados: hiperemia, que visa aumentar o fluxo sanguíneo para o tecido lesionado para que os leucócitos cheguem ao local da lesão a fim de realizar a fagocitose; infiltrado inflamatório, presença de leucócitos no local da lesão, estes se deslocaram até lá por ação dos mediadores quimiotáticos; e os agregados linfóides hiperplásicos se encontram aumentados, pois os mediadores da inflamação estimulam a síntese dos linfócitos (que serão armazenados nos agregados linfóides após a maturação) para que estes possam “combater” o agente infeccioso¹.

No presente estudo foi possível infectar camundongos Swiss com *Blastocystis* sp com todos os inóculos (100 a 10.000 cistos), enquanto que em outro trabalho semelhante a infecção só foi possível com inóculos maiores que 40.000.000 formas parasitárias⁸. Outros autores ⁹ observaram relação entre infectividade de diferentes genótipos de *Blastocystis* sp e inóculo quando frangos e ratos foram desafiados com inóculos que variaram de 100 a 1.000.000. Com esses mesmos inóculos TANIZAKI *et al.* (2005)²³ verificaram que apenas um isolado não se mostrou infectante na dose de 100 cistos.

Quanto ao período de infecção foi observado nesse trabalho que 60% dos animais pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 já eliminaram formas vacuolares nas fezes dois dias após a administração oral dos cistos, enquanto nos grupos G4 e G5 os exames parasitológicos

se positivaram com até sete dias de infecção. Estes resultados mostram que para animais que receberam maiores inóculos o tempo de detecção da infecção foi menor, corroborando com Elwakil e Hewedi (2010)⁶.

Formas vacuolares de *Blastocystis* sp foram observadas nas três porções do trato intestinal, com predileção para o ceco, seguido pelo intestino grosso e delgado, sendo que no intestino grosso e ceco ocorreram as alterações histopatológicas de maior intensidade, corroborando com os achados de outros autores^{6,26,27}. *Blastocystis* sp foi também observado nas diferentes camadas do trato intestinal, sendo que no intestino grosso foi visualizado invadindo a túnica muscular, mostrando seu potencial patogênico. O animal que apresentou essa forma invasiva foi infectado com 5.000 cistos e sacrificado no 7º. dia de infecção. Esses resultados mais uma vez mostram que a patogenicidade de *Blastocystis* sp tem relação com o inóculo e tempo de infecção, pois esse foi o segundo maior inóculo e o menor tempo avaliado. Tal caráter invasivo pode ser indício da virulência do parasito, já que a infiltração tecidual geralmente desencadeia reações inflamatórias mais intensas. ELWAKIL & HEWEDI (2010)⁶ também observaram implantação do parasito na túnica muscular além de outras alterações patológicas. Apesar de esses autores utilizarem inóculos muito maiores (40.000.000) e observarem alterações com 14 dias de infecção, os resultados por eles obtidos corroboram com a afirmativa de que a patogenicidade de *Blastocystis* sp tem relação com inóculo e tempo de infecção.

A invasão da túnica muscular aumenta as chances de ocorrer a forma extra-intestinal da doença, levando a efeitos sistêmicos. VOGELBERG *et al.* (2010)²⁴ relataram um quadro de urticária generalizada em um paciente com diarreia aguda e exame parasitológico positivo para *Blastocystis* sp. A biópsia revelou a presença de formas parasitárias e reação inflamatória na mucosa do cólon intestinal. Outros autores também conferiram potencial patogênico à este parasito pelo encontro de úlceras no ceco e reto, processo inflamatório agudo e crônico, além

de formas parasitárias de *Blastocystis* sp na túnica muscular do intestino grosso ^{6,13,27}. Por outro lado, vários autores ^{8,10,28} relataram que *Blastocystis* sp é um protozoário não patogênico, por não observarem lesões invasivas no trato intestinal de pacientes, bem como dos camundongos e ratos oralmente infectados com esse parasito.

A presença do parasito no tecido é um fator estimulante para o surgimento da resposta inflamatória no hospedeiro. No presente estudo, a implantação das formas vacuolares de *Blastocystis* sp nos tecidos de camundongos infectados, ou a simples passagem pelo trato intestinal foram capazes de desencadear no início da infecção intenso infiltrado inflamatório com predominância de leucócitos mononucleados e a presença de eosinófilos, sendo estes característicos de doenças de ordem alérgica e parasitária ¹. Outros autores ^{6,27} também mostraram que a reação inflamatória causada por *Blastocystis* sp possui características um tanto distintas das reações tradicionais, pelo encontro de monócitos e linfócitos (leucócitos mononucleados) no estroma da região ileocecal dos camundongos oralmente infectados e pela presença no ceco e cólon de infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos, histiócitos e poucos eosinófilos.

Agregados linfóides hiperplásicos foram observados em cortes com intensa reação inflamatória em proporção direta com inóculo e tempo de infecção dos animais. A presença desses tecidos linfóides hiperplásicos na infecção por *Blastocystis* sp e principalmente sua relação com essas duas variáveis ainda não foi relatada por outros autores que estudaram a infectividade e patogenicidade desse parasito em diversos modelos animais ^{3,6,13,24,28}. Estes autores restringiram-se a relatar a presença de intensos exsudatos inflamatórios (agudos e crônicos), necrose tecidual e modificações na estrutura intestinal.

PCR-RFLP mostrou a presença de dois perfis moleculares distintos, referentes aos subtipos 1 e 3 de *Blastocystis* sp. HUSSEIN *et al.*, (2008)⁸ já relacionaram estes subtipos à algumas características patogênicas do parasito. MALHEIROS *et al.* (2011)¹⁷ identificaram os

subtipos: ST1, ST2 e ST3 no estado do Mato Grosso (BR), além de infecções mistas. Embora tenhamos encontrado dois destes subtipos (ST1 e 3) entre as amostras analisadas, não foi possível relacioná-los com a patogenicidade, porque as amostras foram misturadas a fim de obter um grande número de cistos para padronização dos inóculos, constituindo isso uma limitação do estudo.

CONCLUSÕES

Blastocystis sp apresenta características patogênicas, ciclo biológico de curta duração e poucos cistos são necessários para se infectar o hospedeiro.

A patogenicidade de *Blastocystis* sp tem relação com inóculo por influenciar na intensidade e número dos processos inflamatórios e na quantidade de agregados linfóides hiperplásicos e no tempo em que eles ocorreram.

A patogenicidade de *Blastocystis* sp tem relação com tempo de infecção pelo encontro precoce de maior quantidade de formas vacuolares nos tecidos dos animais avaliados e de tecidos linfóides hiperplásicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Programa de Apoio à Pós Graduação (PROAP) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS AK, KUMAR V, FAUSTO N, ASTER JC. Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças. 8º ed. São Paulo: Elsevier; 2010.
2. AMATO NETO V, ALARCÓN RSR, GAKIYA E, BEZERRA RC, FERREIRA CS, BRAZ LMA. Blastocistose: controvérsias e indefinições. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:515-7.
3. ANDIRAN N, ACIKGOZ ZC, TURKAY S, ANDIRAN F. *Blastocystis hominis* – an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. J Ped Surg. 2006;41:1489-91.
4. CLARK CG. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol Biochem Parasitol. 1997;87:79-83.
5. DOMÍNGUEZ-MARQUES MV, GUNA R, MUÑOZ C, GÓMEZ-MUÑOZ MT, BORRÁS R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res. 2009;105:949-55.
6. ELWAKIL HS, HEWEDI IH, Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. Parasitol Res. 2010;107:685-9.
7. HOFFMANN WA, PONS JA, JANER JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico J Public Health Trop Med. 1934;9:283-91.
8. HUSSEIN EM, HUSSEIN AM, EIDA MM, ATWA MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitol Res. 2008;102:853-60.
9. IGUCHI A, EBISU A, NAGATA S, SAITOU Y, YOSHIKAWA H, IWATANI S, KIMATA I. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats. Parasitol Int. 2007;56:107-112.
10. IGUCHI A, YOSHIKAWA H, YAMADA M, KIMATA I, ARIZONO N. Expresión of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. Parasitol Res. 2009;105:135-40.

11. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. Biological evaluation of medical devices. Genève: ISO – 10993-3. 1992:2-7.
12. IRIKOV OA, ANTOKHIN AI, ROMANOV YA. Study of the Dynamics of *Blastocystis Hominis* Reproduction *In Vitro*. Bull Exp Biol Med. 2009;148:99-102.
13. JANARTHANAN S, KHOURY N, ANTAKI F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. Endoscopy. 2011;43:185-6.
14. JONES WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*: with a method for evaluation the anti-amoebic properties of new compounds. Ann Trop Med Parasitol. 1946;40:128-40.
15. MAAMOURI N, AYED SB, AOUN K, MAMI NB, BOURATBINE A. Prévalence et type des parasitoses associées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Rev Med Interne. 2011;32S:S313-S434.
16. MACEDO HWde, GONÇALVES AMH, ALMEIDA CBde, DIAS LVB, MUNIZ MF. Infecção por *Blastocystis hominis* e *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba díspar* em pacientes atendidos em um hospital localizado em Niterói, Rio de Janeiro. Rev Pat Trop. 2010;39:56-62.
17. MALHEIROS AF, STENSVOLD CR, CLARK CG. Molecular Characterization of *Blastocystis* Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2011;85:1050-3.
18. SOHAIL MR, FISCHER PR. *Blastocystis hominis* and travelers. Trav Med Infect Dis. 2005;3:33-8.
19. STENSVOLD CR, SMITH HV, NAGEL RF, OLSEN KEP, TRAUB RJ. Eradication of *Blastocystis* Carriage With Antimicrobials: Reality or Delusion? J Clin Gastroenterol. 2010;44:85-90.

20. STENSVOLD CR, NIELSEN HV, MOLBAK K, SMITH HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. Trends Parasitol. 2008;25:23-39.
21. TAN KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008;21:639-65.
22. TAN TC, SURESH KG. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. Parasitol Res. 2006;99:737-42.
23. TANIZAKI A, YOSHIKAWA H, IWATANI, KIMATA I. Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. Parasitol Res. 2005;96:57-61.
24. VOGELBERG C, STENSVOLD CR, MONECKE S, DITZEN A, STOPSACK K, HEINRICH-GRÄFE U, PÖHLMANN C. *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. Parasitol Int. 2010;59:469-71.
25. YOSHIKAWA H, MORIMOTO K, NAGASHIMA M, MIYAMOTO N. A survey of *Blastocystis* infection in anuran and urodele amphibians. Vet Par. 2004;122:91-102a.
26. YOSHIKAWA H, YOSHIDA K, NAKAJIMA A, YAMANARI K, IWATANI S, KIMATA I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. Parasitol Res. 2004;94:391-6b.
27. ZHANG HW, LI W, YAN QY, HE LJ, SU YP. Impact of *Blastocystis hominis* infection on ultrastructure of intestinal mucosa in mice. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2006;24:187-91.
28. ZUCKERMAN MJ, WATTS MT, HO H, MERIANO FV. *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. Am J Med Sci. 1994;308:96-101.

Tabela 1. Distribuição das formas vacuolares de *Blastocystis* sp encontradas no trato intestinal dos camundongos Swiss oralmente infectados.

Órgão	n (médio) ± S	%	p-valor*
Duodeno	8 ± 0,69	29,63	0,1889
Ceco	13 ± 0,50	48,15	Referência
Intestino Grosso	6 ± 0,52	22,22	0,0608

*Teste Z para comparação de proporções

Tabela 2. Relação entre período de infecção e quantidade de cistos inoculados e a visualização de formas vacuolares de *Blastocystis* sp no trato intestinal de camundongos Swiss oralmente infectados.

Período de infecção (dias)	7*	14	21	28	60	Total
Grupo/Inóculo (cistos)	n° médio de formas vacuolares encontradas					
G1/10.000	2	0	0	2	0	4
G2/5.000	4	0	1	2	0	7
G3/1.000	3	1	0	0	0	4
G4/500	1	1	4	3	0	9
G5/100	0	1	1	1	0	3
Total	10	3	6	8	0	27

*(p<0,05) = formas vacuolares no 7º dia (10) X 60º dia (zero) de infecção

Tabela 3. Relação entre período de infecção e quantidade de cistos inoculados e a visualização de processos inflamatórios no trato intestinal dos camundongos Swiss oralmente infectados.

Período de infecção (dias)	7	14	21	28	60	
Grupo/Inóculo (cistos)	n° médio de processos inflamatórios encontrados					
G1/10.000	2	2	2	1	3	10
G2/5.000	0	0	1	2	1	4
G3/1.000	2	0	2	1	1	6
G4/500	1	0	5	2	0	8
G5/100	1	2	1	1	2	7
Total	6	4	11	7	7	35

Tabela 4. Relação entre período de infecção e quantidade de cistos inoculados na visualização de agregados linfóides hiperplásicos no trato intestinal de camundongos Swiss oralmente infectados.

Período de infecção (dias)	7	14	21	28	60
Grupo/Inóculo (cistos)	Taxa de tecidos linfóides hiperplásicos (%)				
G1/10.000	100	100	0	0	50
G2/5.000	100	100	0	50	0
G3/1.000	0	33,3	0	0	50
G4/500	0	0	100	0	0
G5/100	0	66,7	0	33,3	0

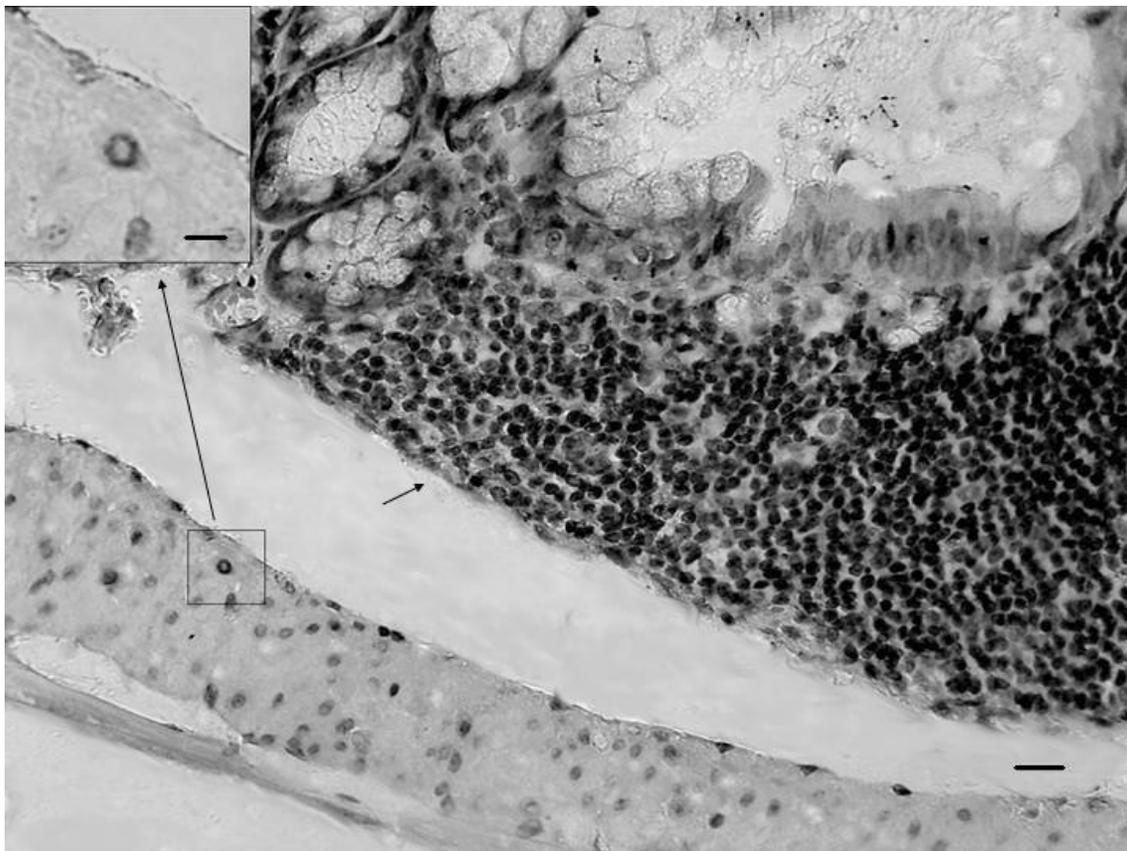


Figura 1. Porção do intestino grosso contendo parte de um agregado linfóide hiperplásico (seta menor) e uma forma vacuolar de *Blastocystis* sp implantada na túnica muscular (quadrante superior esquerdo – seta maior. Barra: 25 μ m) do referido tecido H & E 400X, além da presença de grânulos periféricos e um vacúolo central H & E 1000X. Barra: 100 μ m.

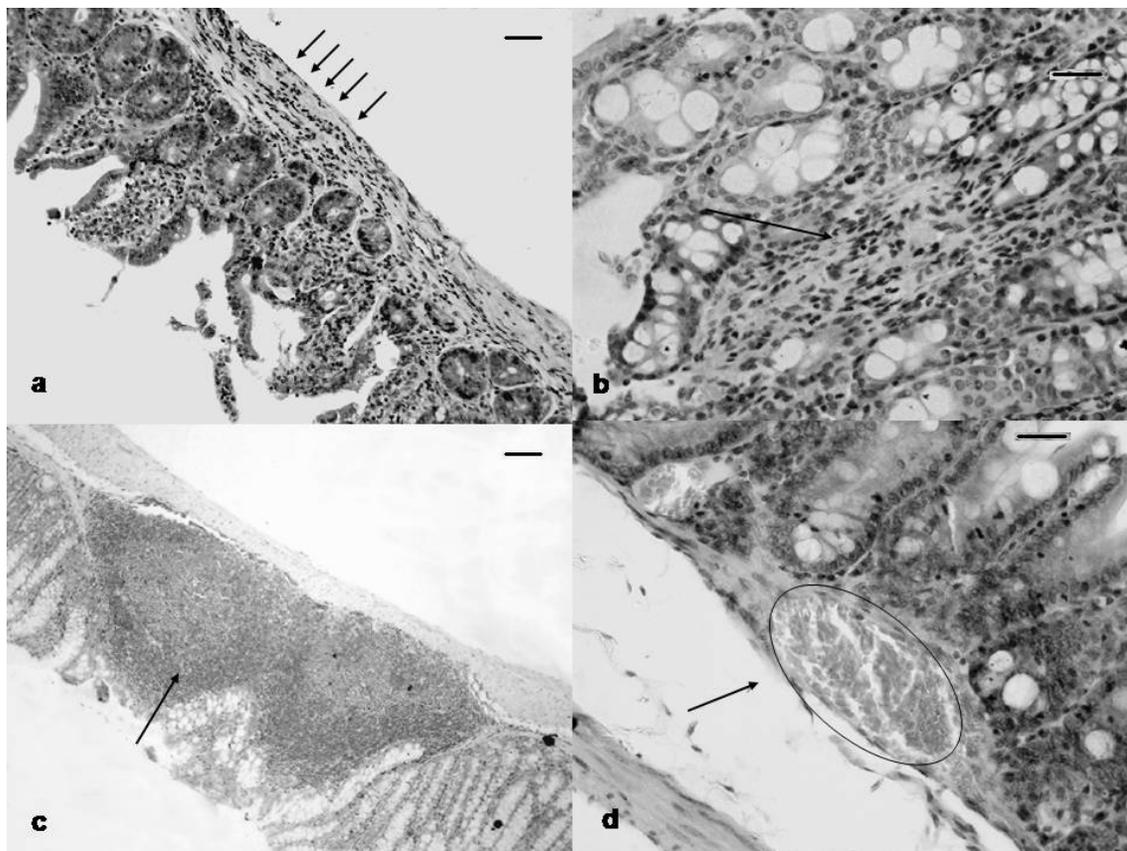


Figura 2. **a e b)** Infiltrado inflamatório com predominância de leucócitos mononucleados (setas), na túnica muscular (a) e na túnica mucosa (b), H & E, duodeno 200 X (barra: 150 μ m) e cólon proximal 400 X (barra: 100 μ m), respectivamente. **c)** Agregado linfóide hiperplásico em corte de intestino grosso, H & E, 100 X (seta). Barra: 300 μ m. **d)** Vaso com hiperemia (círculo setado) em corte do ceco, H & E, 400 X. Barra: 100 μ m.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Blastocystis sp apresenta características patogênicas, ciclo biológico de curta duração e poucos cistos são necessários para se infectar o hospedeiro.

A patogenicidade de *Blastocystis* sp tem relação com inóculo por influenciar na intensidade e número dos processos inflamatórios e na quantidade de tecidos linfóides hiperplásicos e no tempo em que eles ocorreram.

A patogenicidade de *Blastocystis* sp tem relação com tempo de infecção pelo encontro precoce de maior quantidade de formas vacuolares nos tecidos dos animais avaliados e de tecidos linfóides hiperplásicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho foi observado que a patogenicidade de *Blastocystis* sp em camundongos swiss tem relação com o inóculo e tempo de infecção. Para entender melhor essa relação e verificar se ela sofre influência ou não da resposta do hospedeiro poderiam ser realizados experimentos em outros modelos de laboratório como ratos wistar, coelhos e etc.

Como os dois subtipos detectados no presente trabalho não puderam ser relacionados com as características patogênicas de *Blastocystis* sp, poderia-se ampliar o número de amostras e verificar se somente esses dois subtipos circulam nessa região e relacioná-los com a patogenicidade desse parasito, enfocando diferentes inóculos e tempos de infecção.