



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
COMPARADA

MARCELO ALBERTO ELIAS

Caracterização da enteropatia induzida pela infecção com *Giardia duodenalis*
em camundongos Swiss e análise da eficiência de antiparasitários em seu
controle

Maringá
2015

MARCELO ALBERTO ELIAS

Caracterização da enteropatia induzida pela infecção com *Giardia duodenalis*
em camundongos Swiss e análise da eficiência de antiparasitários em seu
controle

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Comparada, Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Biologia das
Interações Orgânicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Débora de Mello Gonçalves
Sant'Ana

Maringá
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

E42e	<p>Elias, Marcelo Alberto</p> <p>Efeitos da infecção experimental por giardia duodenalis sobre a parede do duodeno de camundongos Swiss / Marcelo Alberto Elias. -- Maringá, 2015. 60 f. : il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dr.^a Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2015.</p> <p>1. Giardia duodenalis - Infecção. 2. Giardiase - Parasitose ratos. 3. Giardia duodenalis - Enteropatia. 4. Giardia duodenalis - Antiparasitários. I. Sant'Ana, Débora de Mello Gonçalves, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.</p> <p>CDD 21.ed. 616.929</p>
------	---

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARCELO ALBERTO ELIAS

Caracterização da enteropatia induzida pela infecção com *Giardia duodenalis* em camundongos Swiss e análise da eficiência de antiparasitários em seu controle

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

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a Dr^a Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Áurea Regina Telles Pupulim
Universidade Estadual de Maringá

Prof Dr Paulo Alexandre Galvanini
Universidade Federal de Sergipe

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2015.

Local de defesa: Bloco H79, sala 08, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus Criador “*O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato não os despreza*” Eclo 38,4

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é a memória do coração”

(ANTÍSTENES)

Nesse espaço tão especial quero deixar a memória do meu coração a pessoas mais que especiais:

Primeiramente a Deus que me presenteou todos os dias com o Fôlego de Vida, sem Ele eu não chegaria até aqui.

A professora “Débora de Mello Gonçales Sant’Ana” pela orientação tão séria e dedicada e pelo exemplo a ser seguido de profissional e pessoa comprometida com o que faz.

A minha esposa Thaise, companheira, amiga e amor da minha vida. Minha filha Isabella, princesinha e flor de todos os meus dias. Agradeço pelo amor, carinho, paciência e compreensão nesse período. Amo vocês.

A minha mãe pelo dom da vida e doadora dos genes da curiosidade científica, obrigado por acreditar sempre em mim.

A meu irmão, sogro, sogra, cunhados, cunhadas e sobrinhos por serem parte importante da minha vida.

A todos os amigos de laboratório, Suelen, Rafael, Cristina, Marcelo Biondaro, Larissa Bianchi, Elen Paula, Elen Polyana, Lainy, Paulo, Eliane e Mariana que em vários momentos grandes ou pequenos contribuíram para essa conquista tão desejada.

Um agradecimento especial a Aline pelos enormes amparos e auxílios em muitos momentos.

A Estela, secretária do PGB, que sempre me atendeu com muita atenção e carinho.

A professora Gessilda Alcantara Nogueira de Melo que me auxiliou em muitos momentos importantes da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada (PGB), a todos os professores e à coordenação pela responsabilidade dedicação e confiança.

A técnica do laboratório de pesquisa Cleonira Sarro, pelo auxílio e socorro tão prestativo sempre que necessário.

Ao Departamento de Ciências Morfológicas, pelo espaço concedido e apoio no que foi preciso.

A todos meus colegas de docência e aos meus alunos, tanto do colégio CCI quanto da Faculdade Integrado, que sempre me incentivaram com palavras de ânimo.

Enfim, Obrigado a todos que fizeram parte do conjunto da “ópera” e me permitiram compor essa linda “obra”.

EPÍGRAFE

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”

(ELLEANOR ROOSEVELT)

Caracterização da enteropatia induzida pela infecção com *Giardia duodenalis* em camundongos Swiss e análise da eficiência de antiparasitários em seu controle

RESUMO

Giardia duodenalis é um protozoário microscópico que parasita o intestino dos mamíferos, inclusive de seres humanos, caracterizando assim uma zoonose. Nos seres humanos a prevalência é maior nas crianças no intestino delgado, principalmente em no duodeno e jejuno. Objetivamos analisar a parede intestinal e as células do epitélio do duodeno de camundongos infectados por *G. duodenalis* (assemblagem A) e submetidos a quatro tipos de tratamentos antiparasitários distintos. A pesquisa foi realizada com 48 camundongos Swiss machos de 21 dias de idade que receberam 1.000 cistos de *Giardia duodenalis* (assemblagem A) via oral. Os animais foram separados em seis grupos: Controle negativo (G1), controle positivo (G2), e grupos de tratamento, tratados com Nitazoxanida (G3), Albendazol (G4), Metronidazol (G5) e Secnidazol (G6). Aos 60 dias de idade, esses camundongos foram submetidos à eutanásia e os duodenos processados histologicamente para análise da parede intestinal e de células epiteliais. Em todos os grupos infectados houve aumento da quantidade de células caliciformes, além do aumento de linfócitos intraepiteliais e células de paneth. Foi observado ainda redução da altura dos vilos e aumento na largura, nas criptas houve aumento de largura e profundidade. Quanto aos tratamentos, eles minimizaram todas as alterações, porém, não foram capazes de reverter completamente o quadro enteropático. Houve ainda hipertrofia de todas as camadas da parede intestinal. Por fim também foram observadas nos enterócitos, aumento de sua altura e largura e de seus respectivos núcleos. Conclui-se que a infecção por *G. duodenalis* causa alterações na estrutura histológica do duodeno. Dentre os quatro medicamentos o metronidazol foi o antiparasitário mais eficiente na atenuação da enteropatia causada pela giardíase.

Palavras-chave: *Giardia spp.* Giardíase. Parasitose. Duodeno. Antiparasitários.

Characterization enteropathy induced by infection with *Giardia duodenalis* in Swiss mice and analysis of parasite efficiency in your control

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a microscopic protozoan parasite gut of mammals, including humans, thus becoming a zoonosis. In humans, the prevalence is higher in children in the small intestine, especially in the duodenum and jejunum segments. Aimed to analyze the intestinal wall and duodenal epithelial cells of mice infected with *G. duodenalis* (the assembly) and subjected to four different types of antiparasitic treatments. The survey was conducted with 48 male Swiss mice 21 days of age who received 1,000 *Giardia duodenalis* (assembly A) orally. The animals were divided into six groups: negative control (G1), positive control group (G2) treatment groups and treated with Nitazoxanide (G3), albendazole (G4), metronidazole (G5) and secnidazole (G6). At 60 days of age, these mice were sacrificed and the duodenum processed histologically for analysis of the intestinal wall and epithelial cells. In all groups there was an increase in the number of goblet cells, and the increase in intraepithelial lymphocytes and Paneth cells. It was also observed reduction in villous height and increase in width in the crypts increased by width and depth. As for the treatments, they minimized the changes, however, were not able to completely reverse the enteropático frame. There was also hypertrophy of all layers of the intestinal wall. Finally were also observed in the enterocytes, increasing its height and width and their respective cores. We conclude that *G. duodenalis* infection causes changes in the histological structure of the duodenum and that the drugs used in treatments minimized the enteropathy, however, were not enough for the total re-establishment. Among the four drugs metronidazole was the most effective antiparasitic in attenuating enteropathy caused by giardiasis.

Keywords: *Giardia spp.* Giardiasis. Parasitosis. Duodenum. Antiparasitic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1** - Antiparasitários e esquema terapêutico utilizados no tratamento de camundongos infectados pela *G. duodenalis*.....44
- Tabela 2** - Altura e largura de enterócitos e maior e menor diâmetro de seus núcleos presentes na mucosa duodenal de camundongos Swiss infectados pela *G. duodenalis* e tratados com antiparasitários.....44
- Tabela 3** - Células caliciformes e linfócitos intraepiteliais / 100 células epiteliais e células de Paneth no duodeno de camundongos Swisss infectados pela *G. duodenalis* e tratados com antiparasitários.....45
- Tabela 4** - Morfometria da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), evidenciados pela coloração de HE.....45
- Figura 1-** (A) Altura dos vilos e profundidade das criptas; (B) largura dos vilos e das criptas, do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), evidenciados pela coloração de HE. A diferença estatística com o G1 é representada pelo * ($p < 0,05$).....46
- Figura 2** - Micrografia de cortes transversais do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) evidenciados pela coloração de HE. As setas demonstram células de paneth, sendo possível observar aumento dessas células no grupo infectado e nos diferentes tratamentos.....47
- Figura 3-** Micrografia de cortes transversais do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) evidenciados pela coloração de HE. As setas demonstram linfócitos intra epiteliais, sendo possível observar aumento dessas células no grupo infectado e nos diferentes tratamentos.....48

Figura 4 - Micrografia de cortes transversais do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) evidenciados pela coloração de HE. Sendo possível observar diminuição na altura dos vilos e aumento da largura dos vilos, profundidade e largura das criptas em relação ao controle.....49

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1 <i>Introdução</i>	14
2 <i>Revisão Bibliográfica</i>	16
2.1 Sistema Digestório.....	16
2.2 Duodeno.....	18
2.3 Patogenia.....	19
2.4 Resposta imune.....	20
2.5 Tratamento da giardíase.....	21
2.6 Justificativa.....	22
2.7 Objetivos.....	22
2.7.1 Objetivo geral.....	22
2.7.2 Objetivos específicos.....	22
3 <i>Referências Bibliográficas</i>	24
CAPÍTULO 2.....	27
<i>Artigo: “Metronidazol: maior eficiência na atenuação da enteropatia causada pela Giardia duodenalis”</i>	27
ANEXOS	54
<i>Normas do periódico “American Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i>	54
<i>Certificado de aprovação no Comitê de ética em experimentação animal</i>	61

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Giardia duodenalis (sinonímia: *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*, *Lambliia intestinalis*) é uma espécie que parasita o intestino humano e se propaga por cistos. Desde 2005 a Sociedade Internacional de Parasitologia baseada em uma classificação molecular distribuiu os eucariotas em seis grandes grupos dentro do Reino Protista, e a *Giardia duodenalis* passou a pertencer ao Super grupo Excavata, divisão Fornicata, subdivisão Eopharyngia e ordem Diplomonadida (REY, 2011). Os Diplomonadida apresentam um par de núcleos, um duplo conjunto cinético com quatro cinetossomos cada e respectivos flagelos, e, a nutrição se dá por pinocitose. *G. duodenalis* apresenta apenas duas formas em seu ciclo vital, sendo elas: trofozoíto e cisto (NEVES, 2009; REY, 2011).

De acordo com Rey (2011) e Pestechien et al. (2014), estudos de epidemiologia e genética permitiram distinguir cinco espécies de *Giardia*: *G. duodenalis* (parasita amplo grupo de animais silvestres e domésticos além do homem), *G. muris* (de roedores), *G. psitaci* e *G. ardeae* (encontrado em aves) e *G. agilis* (encontrado em anfíbios). *G. duodenalis* engloba uma variedade de genótipos distintos, porém morfologicamente similares, os quais apresentam diferentes especificidades de hospedeiros. Tais linhagens formam sete agrupamentos identificados de A à G e também denominados assemblagens. Nos seres humanos há a predominância das assemblagens A e B e atualmente busca-se a correlação entre assemblagem e a sintomatologia clínica, tema ainda controverso (CARVALHO, 2011; PESTECHIEN et al., 2014).

Possui ciclo biológico monoxênico, relativamente simples em que a infecção ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados por cistos que podem permanecer no ambiente especialmente na água por dois ou mais meses. Quando ingeridos, ao passarem pelo trato digestório especialmente pelo estômago sofrem ação ácida dos sucos gástricos e desencistam no duodeno. A partir daí inicia-se um processo intenso de reprodução assexuada (divisão binária longitudinal) e em poucos dias podem existir milhares de trofozoítos cobrindo a mucosa do duodeno, muitos desses se desprendem e seguem o trajeto do bolo alimentar chegando ao jejuno e principalmente ao ceco onde iniciam o processo de encistamento para serem eliminados nas fezes (NEVES, 2009; REY, 2011; NEIVA et al., 2014).

Na relação parasito-hospedeiro merece destaque a patogenia da giardíase (ou lamblíase) acompanhada de sua sintomatologia. Ainda existem discussões sobre a sua capacidade patogênica de *G. duodenalis*, entretanto, alguns autores descrevem casos de

diarreia recorrente, evacuações líquidas e pastosas, número aumentado de evacuações, mal estar intestinal, cólicas abdominais, perda de peso e com menor frequência, diminuição do apetite, náuseas, vômitos, flatulência, distensão abdominal, febre, cefaleia e nervosismo (REY, 2011, HALLIEZ e BURET, 2013).

Os sintomas estão intimamente ligados ao sistema digestório, por ser esse o habitat do parasito. O sistema digestório consiste no trato digestivo (cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso e ânus) e glândulas associadas (salivares, fígado e pâncreas). Sua função é obter as moléculas necessárias para a manutenção, crescimento e as demais necessidades energéticas do organismo a partir dos alimentos ingeridos. Porém, além dessa função primordial o trato possui uma barreira protetora formada pela camada mais interna do tubo digestório (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Todos os componentes do trato digestivo apresentam certas características estruturais em comum. Trata-se de um tubo oco composto por um lúmen, ou luz, cujo diâmetro é variável, circundado por uma parede formada por quatro camadas distintas: túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Além da barreira mecânica formada pelas túnicas o corpo humano conta com um aliado importante para sua defesa, o sistema imune gastrointestinal, que deve lidar com a presença de bactérias comensais do lúmen tolerando sua presença e evitando sua transposição, bem como, identificar e responder a organismos patogênicos como, *Giardia sp.* (ABBAS et al., 2012).

Em uma revisão sistemática Robertson et al. (2010) apontam as diferenças econômicas como um fator relevante na incidência de giardíase, não excluindo casos esporádicos em países em desenvolvimento. Mostrando assim a importância da conscientização e educação para hábitos de higiene entre a população.

Nesta dissertação apresenta-se um estudo das alterações na parede do duodeno de camundongos infectados por *Giardia duodenalis* (assemblagem A2), e após o tratamento com diferentes medicamentos antiparasitários. No capítulo 1 encontra-se uma breve revisão da literatura sobre o tema e no capítulo 2 o artigo original resultado do experimento desenvolvido.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Sistema Digestório

O sistema digestório é constituído de cavidade oral, tubo digestório e glândulas anexas, que realizam a ingestão, mastigação, deglutição e digestão do alimento e absorção dos nutrientes, além da eliminação dos restos não digeridos. O tubo digestório é a porção responsável por macerar, encaminhar, digerir, selecionar e absorver os elementos nutritivos e a água, sendo subdividido em esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. No humano o intestino delgado é formado pelo duodeno, jejuno e íleo que possuem as funções de digestão e absorção dos nutrientes, enquanto o intestino grosso é formado pelo ceco, colos ascendente, transverso, descendente e sigmoide seguido do reto e do canal anal que fazem a absorção de eletrólitos e água, além de formarem o bolo fecal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O intestino delgado é formado histologicamente por: túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa. A túnica mucosa é altamente vascularizada e composta pelo epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa. Na mucosa são encontrados os vilos, que são projeções da lâmina própria em direção ao lúmen intestinal, que estão recobertas por um epitélio de revestimento simples prismático; além de invaginações epiteliais nos espaços intervilares que formam numerosas glândulas, normalmente denominadas de criptas intestinais. Ao olho nú, os vilos dão um aspecto aveludado ao revestimento da mucosa intestinal, sendo estruturas permanentes e delicadas que aumentam a superfície de digestão e absorção do intestino delgado em cerca de 10 vezes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

No epitélio intestinal as células mais numerosas são os enterócitos, as quais são colunares, cerca de 25 μm de altura, com núcleo oval localizado no polo basal e com uma borda em escova (microvilosidades) no polo apical. Essas células são responsáveis pela digestão terminal de macromoléculas e absorção de água e nutrientes, além de modificar ácidos graxos em triglicerídeos, formar quilomícrons, e transportar nutrientes para vasos sanguíneos e linfáticos da lâmina própria, de onde serão distribuídos para todo o corpo. Os enterócitos também desempenham importante papel na resposta imunitária frente a processos inflamatórios e infecciosos que ocorrem na mucosa, podendo funcionar como células apresentadoras de antígenos ou ainda atuar na produção e secreção de citocinas e quimiocinas com atividade quimiotática e pró-inflamatória no epitélio intestinal (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Células caliciformes também estão presentes no epitélio intestinal, e são glândulas unicelulares com formato de cálice, com sua base apoiada na lâmina basal e com seu polo apical repleto de gotículas secretoras revestidas por membranas voltadas para o lúmen intestinal, de modo a deslocar o citoplasma para a periferia da célula e o núcleo para o polo basal. Essas células possuem a função de produzir e secretar o mucinogênio, cuja forma hidratada é a mucina, componente fundamental do muco que reveste o lúmen intestinal. O muco lubrifica e protege o epitélio contra a abrasão e ação da microbiota intestinal, embora também sirva como fonte de nutrientes para esses microrganismos. Existem ainda nos vilos, as células M que auxiliam o sistema mononuclear fagocitário da mucosa (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As criptas são glândulas simples e tubulares que circundam a base dos vilos e se abrem como perfurações do revestimento interno do intestino. Além de enterócitos e células caliciformes, nas criptas encontram-se também células de reserva, que são as células progenitoras, as células de Paneth, que produzem o agente antimicrobiano lisozima e as células enteroendócrinas (também denominadas de células pertencentes ao sistema neuroendócrino difuso – SNED). As células de Paneth estão localizadas no fundo das criptas e além de secretarem lisozimas, ainda produzem TNF- α , defensinas e criptidinas que ficam armazenados em grânulos contidos em seu citoplasma e que são liberados para proteger a superfície luminal da invasão de microrganismos patogênicos (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Ainda para ajudar a proteger o revestimento epitelial, existem diversos linfócitos localizados na lâmina própria que migram para o epitélio (ABBAS et al., 2012). Quando ocorre a invasão da barreira intestinal por algum microrganismo, os fagócitos são rapidamente recrutados para os locais da invasão, por meio da resposta imune Th1 mediada por macrófagos ou Th2 mediada por neutrófilos, intensificando a migração de diversos linfócitos da lâmina própria para o lúmen intestinal após horas de infecção. Esse fenômeno faz com que um maior número de linfócitos intraepiteliais sejam visualizados em cortes histológicos do intestino. A chegada desses leucócitos qualifica os processos infecciosos do sistema digestório (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A lâmina própria situa-se abaixo do epitélio intestinal e é constituída de tecido conjuntivo frouxo, abrigando diversos vasos sanguíneos e linfáticos de pequeno calibre (capilares), além de envolver externamente glândulas e nódulos linfáticos ocasionais. A muscular da mucosa circunda a lâmina própria, delimitando a mucosa e a submucosa. Ela é composta por células musculares lisas reunidas em uma camada circular interna e uma

longitudinal externa que são responsáveis por desenvolverem contrações rítmicas que movimentam os vilos de forma intensa durante a digestão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A tela submucosa é formada por tecido conjuntivo denso fibroelástico não-modelado com a presença de numerosos vasos sanguíneos e linfáticos de maior calibre (arteríolas e vênulas). Nesta tela ainda encontra-se o plexo submucoso, componente nervoso que controla a motilidade da mucosa, a atividade secretora das glândulas e a vasomotricidade. A túnica muscular é formada por dois estratos de músculo liso: o estrato circular da túnica muscular (interna) e o estrato longitudinal da túnica muscular (externa). Essas fibras musculares são responsáveis pela atividade motora intestinal, além de possuírem uma ampla rede de células do sistema imune. Entre os dois estratos da túnica muscular situa-se o plexo mioentérico, outro componente nervoso que regula a atividade peristáltica, bem como outros tipos de movimentos exercidos pela túnica muscular. A túnica serosa é formada por tecido conjuntivo frouxo que recobre externamente todo o tubo intestinal. Essa túnica é chamada de serosa quando o segmento do tubo digestório é revestido por peritônio, e conhecida como adventícia quando o segmento é retroperitoneal, como é o caso do esôfago (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.2 Duodeno

O duodeno é o primeiro segmento do intestino delgado, medindo cerca de 25 cm no humano, é o local onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e parte da absorção dos nutrientes. Em ratos o duodeno tem aspecto morfológico semelhante ao do homem, localizado na região abdominal, possui formato de C, com paredes mais espessas que o restante do intestino delgado e se apresenta proporcionalmente maior que o duodeno humano, medindo em torno de 4 e 7 cm de comprimento. Nele ocorre a liberação da bile, que é produzida pelo fígado, armazenada na vesícula biliar e encaminhada pelo ducto colédoco até o lúmen intestinal. Também no duodeno é secretado o suco pancreático, produzido pelos ácinos pancreáticos e transportado pelos ductos pancreáticos até o lúmen intestinal. A ação dessas secreções digestivas sobre o quimo resulta na fase final de digestão dos alimentos, chamada de quilo, na qual já existem substâncias modificadas a ponto de serem absorvidas na mucosa do duodeno e principalmente na do jejuno e do íleo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Na túnica submucosa do duodeno existem as glândulas de Brünner ou glândulas duodenais, cujos ductos penetram na mucosa, perfurando a base das criptas e secretam no lúmen do duodeno uma secreção mucosa alcalina, que ajuda neutralizar o quimo ácido

proveniente do estômago. Na mucosa duodenal percebe-se que os vilos são mais largos, mais altos e mais numerosos que os vilos do jejuno e do íleo, e que as células caliciformes, responsáveis pela secreção de muco, são menos numerosas que nos demais segmentos (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A chegada do quimo semi-processado do estômago ao duodeno faz com que o contato do quimo com a parede duodenal controle a velocidade do esvaziamento gástrico, ativando vias reflexas, compostas de componentes neuronais e hormonais que coordenam as atividades motoras e secretoras do estômago, fígado, pâncreas e do próprio duodeno, responsáveis pelas demais etapas da digestão e absorção dos nutrientes (ELIA; SOUZA, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

No intestino delgado ocorre a fixação de *Giardia duodenalis* na forma de trofozoito (REY, 2011). O duodeno é um segmento curto, com pH mais baixo que os outros segmentos do intestino delgado e possui glândulas responsáveis pela produção de uma espessa camada de muco que recobre o epitélio intestinal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Esses fatores inerentes ao órgão podem dificultar a fixação do parasito pela mucosa intestinal do duodeno.

2.3 Patogenia

Muitas pesquisas têm tentado elucidar o mecanismo da má-absorção intestinal na giardíase, e vão desde investigação da frequência parasitária em crianças de creches até o desenvolvimento de técnicas diferenciadas para avaliação do índice de adesão do parasito ao hospedeiro.

Mascarini e Donalísio (2006), realizando um estudo investigativo da frequência relativa de enteroparasitos em crianças das creches do estado de São Paulo, apontaram a *G. duodenalis* como o parasito mais frequente e recorrente. Koot et al. (2009), utilizando endoscopia digestiva e análises histológicas observaram também em crianças, significativas alterações intestinais tais como, atrofia das vilosidades e inflamação crônica da mucosa, muitas vezes de natureza eosinofílica.

Diante da importância da compreensão do índice de adesão do parasito ao tecido hospedeiro Brigagão e Souza (2012) desenvolveram a técnica de microscopia eletrônica de varredura ambiental tornando-a uma ferramenta diferenciada para o estudo *in vitro*. Mokrzycka et al. (2010) em biópsias duodenais de crianças infectadas por *G. duodenalis*, utilizando estudos morfológicos e imunohistoquímicos sugeriram que as alterações patológicas podem causar má absorção e ter uma influência negativa sobre a defesa da parede intestinal contra a infecção pelo trofozoíto. Araújo et al. (2007) também analisaram a relação entre quantidade

de inóculo e alterações morfológicas e encontraram alterações histopatológicas geradas por colonização intestinal a partir de inóculos crescentes de *G. duodenalis*.

A fisiopatogenia da giardíase e o aumento da permeabilidade intestinal parecem ser dependente de fatores do parasito como a capacidade de aderência dos trofozoítos ao epitélio (MULLER ; ALLMEN, 2005) e do hospedeiro como perda da área de borda em escova, achatamento das vilosidades, inibição das dissacaridasas, supercrescimento da microbiota entérica e aumento dos linfócitos intraepiteliais (LIE) (MULLER ; ALLMEN, 2005).

Ventura et al. (2013) e Bartelt et al.(2013) sugerem que a desnutrição causa alterações na estrutura das vilosidades intestinais e em animais desnutridos infectados com *Giardia sp.*, há maior gravidade da giardíase, facilitando a sobrevivência do parasito. Yu et al.(2008) apontam ainda a infecção como indutor da apoptose de enterócitos.

Neste sentido, Shukla et al. (2012) sugerem a suplementação com *Lactobacillus casei*, em camundongos infectados por *G. duodenalis* por sua ação probiótica que auxilia na restauração do peso corporal, ação de enzimas e atrofia intestinal, no equilíbrio da produção de muco proveniente das células caliciformes e reduzindo as manifestações clínicas através da eliminação dos parasitos

Macotela et al. (2008) contradizendo os relatos de que a *Giardia sp.* encontra-se aderida à superfície do epitélio intestinal, apresenta alguns elementos comprovativos de que a hiperplasia das células caliciformes poderiam ser prejudiciais à barreira epitelial e dar origem a portais permitindo a invasão de tecidos pelo parasito. Esta hipótese havia sido levantada por Buret (2007) que sugere que o parasito pode penetrar o epitélio, invadindo tecidos circundantes e até mesmo entrando na corrente sanguínea.

2.4 Resposta imune

De maneira dinâmica o sistema imunológico associa-se junto ao sistema digestório na finalidade de eliminar as infecções e de desenvolver estratégias de tolerância imune. Diferentes agentes infecciosos estimulam distintos tipos de respostas imunes e em alguns casos a própria resposta torna-se a causa da lesão tecidual (ABBAS et al., 2012).

Os parasitos dão origem a infecções crônicas e persistentes, porque a imunidade inata é insuficiente e estes desenvolveram mecanismos de evasão e sobrevivência resistindo à imunidade não específica. A diversidade estrutural e antigênica dos parasitos patogênicos é refletida pela heterogeneidade de respostas imunológicas. Protozoários que vivem dentro das células dos hospedeiros são destruídos pela imunidade mediada por células enquanto aqueles

que vivem no meio extracelular são eliminados por anticorpos IgE e por destruição mediada por eosinófilos, assim como outros leucócitos (ABBAS et al., 2012).

Assim, diversos trabalhos evidenciam a ação do sistema imunológico frente à infecção por *Giardia sp.* O aumento de linfócitos T associado à interleucina 6 (IL-6), podem contribuir para a defesa contra os protozoários na infecção por *Giardia muris* em camundongos (HEYWORTH, 2014). Em camundongos infectados por *G. intestinalis* há um aumento do número de linfócitos intraepiteliais (LIE), indicando envolvimento de processos imunológicos locais, visando uma maior proteção e defesa ao hospedeiro (MACIORKOWSKA et al., 2005; GOYAL e SHUKLA, 2013). Além deles os linfócitos T circulantes também são aumentados na infecção visando a regulação da resposta imune frente à agressão (MOHAMMAD; KOSHAK, 2013).

Dessa forma é possível afirmar que a imunidade da mucosa é extremamente importante no combate da giardíase.

2.5 Tratamento da giardíase

O tratamento e cura da giardíase dá-se normalmente pelo uso dos derivados nitroimidazólicos: metronidazol, ornidazol, tinidazol e nitorazol (REY, 2011). No entanto, é difícil afirmar qual a droga mais adequada ou mais eficiente diante de resultados controversos. Por exemplo, pesquisas administrando doses únicas de albendazol não o demonstraram eficientes no tratamento da infecção pela *G. duodenalis* em crianças (BAILEY et al., 2013). Já em estudos comparativo albendazol foi tão eficiente quanto outros antiparasitários (metronidazol, furazolidona, tinidazol e secnidazol), porém com melhor tolerância por parte dos pacientes (SHUKLA et al., 2013).

Em outra pesquisa o mesmo medicamento em doses baixas provocou o encistamento do parasito no jejuno e ceco (PÉREZ et al., 2013). Pavanelli (2013) estudando a infecção pela *G. duodenalis* em camundongos Swiss demonstrou que o metronidazol seria a melhor opção terapêutica para o tratamento e cura desta parasitose.

Por outro lado, no Alasca e no México o tratamento com metronidazol, nitazoxanida, e albendazol falharam na erradicação da infecção e a cura veio com a combinação de paromomicina e metronidazol (NASH, 2013). Yadav et al. (2014) também sugere a combinação de fármacos juntamente com um tratamento mais prolongado para casos refratários de giardíase.

Rossignol (2010) afirma ainda que albendazol e nitazoxanida são eficazes contra a giardíase, mas requerem múltiplas doses, sendo a nitazoxanida o primeiro novo medicamento

desenvolvido para o tratamento da giardíase em mais de 20 anos. Enfim, existe uma necessidade de novas drogas giardicidas devido às falhas nos tratamentos com os fármacos existentes no mercado atual (WRIGHT, 2003). Bem como melhor compreensão dos mecanismos de ação e esquema terapêuticos dos antiparasitários existentes.

2.6 JUSTIFICATIVA

A giardíase é uma das causas não virais mais comuns da diarreia e afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Embora o tratamento medicamentoso esteja disponível, o parasito em alguns casos, é refratário a ele. Além disso, sintomas podem continuar mesmo depois que o parasito foi eliminado, prejudicando a qualidade de vida do paciente. Embora ainda seja muitas vezes considerado uma parasitose sem muitas complicações, a complexidade da *Giardia* spp., e de sua relação com os seus hospedeiros, está se tornando cada vez mais evidente. Seu papel em surtos de doenças diarreicas e associadas à água a torna uma doença infecciosa re-emergente.

Diversos são os trabalhos que sugerem a má absorção intestinal como consequência desta parasitose resultante de modificações na organização tecidual.

No entanto, ainda não foram realizados estudos das respostas teciduais do intestino à infecção após diferentes tipos de tratamento.

Deste modo, com este estudo, visamos compreender a enteropatia causada pela giardíase após a terapia com fármacos existentes para seu tratamento, com o intuito de aprimorar a lacuna que existe sobre esse assunto na literatura e contribuir para a compreensão de possíveis sintomatologia persistente após a quimioterapia antiparasitária.

2.7 OBJETIVOS

2.7.1 OBJETIVO GERAL

Verificar as alterações na parede do duodeno em um modelo experimental para estudo da infecção causada por *Giardia duodenalis* (Assemblagem A2) em camundongos suíços, com e sem tratamento com antiparasitários.

2.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as mudanças que ocorrem diante da infecção causada por *Giardia duodenalis* (Assemblagem A2) no duodeno de camundongos infectados e tratados para giardíase.

Analisar o processo inflamatório na parede intestinal do duodeno de camundongos infectados e tratados para giardíase, verificando possíveis alterações morfométricas na tela submucosa, túnica muscular e parede total.

3. Referências Bibliográficas

ABBAS A.K, KUMAR V, MITCHELL R.N. **Fundamentos de Patologia – Robbins & Cotran**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2012.

ARAÚJO N.S.; MUNDIM M.J.; AMORIM R.M.; VIANA J.C.; QUIROZ R.P.; ROSSI M.A.; CURY M.C. *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 449–457, 2008.

BARTELT A.L.; ROCHE J.; KOLLING G.; BOLICK D.; NORONHA F.; NAYLOR C.; HOFFMAN.N; WARREN C.; SINGER S.; GUERRANT R. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, 2013.

BAILEY C.; LOPEZ S.; CAMERO A.; TAIQUIRI C.; ARTHUARY Y.;MOORE D.A. Factors associated with parasitic infection amongst street children in orphanages across Lima, Peru. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 2, p. 52-7, 2013.

BRIGAGÃO C.M; SOUZA W. Using environmental scanning electron microscopy (ESEM) as a quantitative method to analyse the attachment of *Giardia duodenalis* to epithelial cells. **Elsevier.Micron**, v. 43, p. 494–496, 2012.

BURET A.G. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. **Gut**, v. 56, p. 316–317, 2007.

CARVALHO, M. D. J. S. **Imunodeficiência Comum Variável: Manifestações gastrintestinais a *Giardia lamblia***. 2011. 157 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Clínica) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2011.

ELIA C.C.S.; SOUZA H.S.P. **Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito**. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu; 2001.

GOYAL N.; SHUKLA G. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 5, p.1218-1225, 2013.

HALLIEZ M.C.M.; BURET A.G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 47, p. 8974-8985, 2013.

HEYWORTH M.F. Immunological aspects of *Giardia* infections. **Parasite**, v. 21: articles 55, 2014.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2013.

KOOT B.G.; KATE F.J.; JUFFRIE M.; ROSALINA I.; TAMINIAU J.J.; BENNINGA M.A. Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?:A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 49, p. 304-308, 2009.

MACIORKOWSKA E.; KACKMARSKI M.; KEMONA A. The role of cytokines in giardiasis in children. **Med Wieku Rozwoj**, v. 9, n. 4, p. 665-73, 2005.

- MACOTELO M. P.; GONZALEZ M.A.; REUNOSO R.R.; MARTINEZ G.M.N. Goblet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? **Parasitol Res**, v.102. p. 509–513, 2008.
- MASCARINI L.M.; DONALÍSIO M.R. Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 577-579, 2006.
- MOHAMMAD K.A.; KOSHAK E.A. A prospective study on parasites among expatriate workers in Al-Baha from 2009-2011, Saudi Arabia. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 423-432, 2013.
- MOKRZYCKA M.; KOLASA A.; KOSIERKIEWICZ A.; WISZNIEWSKA B. Inducible Nitric Oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 48, n. 2, p.191-196, 2010.
- MULLER N.; ALLMEN N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1339–1347, 2005.
- NASH T.E. Unraveling how *Giardia* infections cause disease. **The Journal of clinical investigation**, v.123, n.6, p. 2346-7, 2013.
- NEIVA, V.A.; MARIA N.S.R.; FLAVIA R.F.N. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-*Giardia* activity. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 24, p. 215-224, 2014.
- NEVES, D. P . **Parasitologia Dinâmica**. 3ª. edição. São Paulo : Atheneu, 2009.
- PAVANELLI M.F; SILVA A.M.G. **Resistência Medicamentosa e Sinais Clínicos da Infecção pela Assemblagem a de *Giardia intestinalis* em camundongos swiss**. Trabalho acadêmico. Faculdade Integrado de Campo Mourão (Graduação em Farmácia). 12 folhas. 2013.
- PÉREZ R.A.; HERNANDEZ J.M.; CASTILIO R.A.; YEPEZ-MULIA L.; CASTILIO R.; HERNANDEZ L.F.; NOQUEDA T.B.; LUNA A.J.P.; RADILLA G.; LEON A.G. Albendazole and its derivative JVG9 induce encystation on *Giardia intestinalis* trophozoites. **Parasitology research**, v.112, n. 9, p. 3251-7, 2013.
- PESTECHIEN N.; RASEKH H.; ROSTAMI-NEJAD M.; YOUSOFI H.A.; HOSSEINI-SAFA A. Molecular identification of *Giardia lamblia*; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v.7, n.3, p. 168-172, 2014.
- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 4ª. edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2011.
- ROBERTSON L.J.; HANEVIK K.; ESCOBEDO A.A.; MARCH K.; LANGELAND N. Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**, v. 26, n.2, p. 75-82, 2010.
- ROSSIGNOL J.F. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. **Experimental parasitology**, v.124, n.1, p. 45 - 53, 2010.

SHUKLA G.; KLAUR H.; SHARMA L. Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. **Parasitology research**, v.112, n.6, p. 2143-9, 2013.

SHUKLA G.; SIDHU R.K.; VERMA A. Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.102. p. 61–72, 2012.

VENTURA L.L.A.; OLIVEIRA D.R.; VIANA J.C; SANTOS J.F.; CALLIARIM.V.; GOMES M.A. Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. **Experimental Parasitology**, v.133, p.391–395, 2013.

VENTURINI C.D.; ENGROF P.; ELY L.S.; TASCA T.; CART G.A. Interações entre Antiparasitários e Alimentos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.35, n.1, p. 17-23, 2014.

YADAV P.; TAK V.; MIRDHA B.R.; MAKHARIA G.K. Refractory giardiasis: a molecular appraisal from a tertiary care centre in India. **Indian journal of medical microbiology**, v.32, n.4, p. 378-382 , 2014.

YU L.C.H.; HUANG C.Y.; KUO W.T.; SAYER H.; TURNER J.R.; BURET A.G. SGLT-1-mediated glucose uptake protects human intestinal epithelial cells against *Giardia duodenalis*-induced apoptosis. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 8-9, p. 923–934, 2008.

CAPÍTULO 2

Artigo: “Metronidazol: maior eficiência na atenuação da enteropatia causada pela *Giardia duodenalis*”

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico: “*American Journal of Tropical Medicine and Higiene*”.

**“Metronidazol: maior eficiência na atenuação da enteropatia causada pela
Giardia duodenalis”**

Marcelo Alberto Elias*, Mariana Pavanelli, Gessilda de Alcântara Nogueira de Melo,

Débora de Mello Gonçalves Sant’Ana

Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida

Colombo, nº 5790, Bloco H-79, Maringá, PR, CEP 87020-900, Brasil

M.A. Elias* - M. Pavanelli - G.A.N. Melo - D. M. G. Sant’Ana

M.A. Elias (Autor Correspondente)

Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida

Colombo, nº 5790 Bloco H-79, Maringá, PR, CEP 87020-900, Brasil

e-mail: eliasmarceloalberto@hotmail.com Telefone: 55 - 44 - 9109-5039

Palavras-chave: *Giardia spp.* Giardiase. Parasitose. Duodeno. Antiparasitários.

ILUSTRAÇÕES: 04 tabelas, 04 figuras.

Resumo

Objetivamos analisar a enteropatia do duodeno de camundongos infectados por *Giardia duodenalis* (assemblagem A) e submetidos a quatro tipos de tratamentos antiparasitários distintos. A pesquisa foi realizada com 48 camundongos *Swiss* machos de 21 dias de idade que receberam 1.000 cistos do parasito via oral. Os animais foram separados em seis grupos: Controle negativo (G1), controle positivo (G2), e grupos de tratamento, tratados com: Nitazoxanida (G3), Albendazol (G4), Metronidazol (G5) e Secnidazol (G6). Após eutanásia e análise histopatológicas do duodeno os resultados foram: Em todos os grupos o houve aumento de células caliciformes neutras e ácidas, linfócitos intraepiteliais e células de Paneth. Foi observado redução da altura dos vilos e aumento na largura, nas criptas houve aumento de largura e profundidade. Observou-se ainda hipertrofia em todas as camadas da parede intestinal e dos enterócitos. Conclui-se que dentre os quatro tratamentos o metronidazol foi o mais eficiente na atenuação da enteropatia provocada pela infecção por *G. duodenalis*, já que reverteu o aumento de linfócitos intraepiteliais e células de Paneth e atenuou os demais elementos investigados.

Palavras-chave *Giardia spp.* Giardíase. Parasitose. Duodeno. Antiparasitários.

Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) *Giardia duodenalis* é um dos parasitos intestinais mais frequentes em seres humanos, com uma estimativa de 400 milhões de indivíduos infectados¹ e índices de prevalência que variam de 0,9% a 42,9% em humanos e 3,0% a 64,3% em animais.² Em países desenvolvidos é causa de frequentes surtos epidêmicos de diarreia associados à água para consumo contaminada e nos países em desenvolvimento é uma causa comum de diarreia infecciosa, sobretudo em crianças, podendo prejudicar seu

desenvolvimento satisfatório. É uma doença negligenciada e guarda estreita relação com a pobreza, falta de saneamento básico e a qualidade da água.³⁻⁵

A giardíase sintomática é auto-limitante e caracterizada por diarreia, cólicas e inchaços abdominais, perda de peso e má absorção. Todavia, a forma assintomática dessa parasitose ocorre com frequência, especialmente nos países em desenvolvimento.⁶⁻⁸ As alterações clínicas da doença são resultantes da enteropatia caracterizada por redução da altura e aumento da largura dos vilos,⁹ aumento na profundidade das criptas,¹⁰ aumento da secreção de mucinas pelas células caliciformes,^{11,12} aumento do número de células de Paneth^{13,14} e linfócitos intraepiteliais (LIE)¹⁵ como resposta a infecção,¹⁶ alteração na renovação do epitélio intestinal e apoptose dos enterócitos.¹⁷

O tratamento da giardíase envolve quimioterápicos, com fármacos únicos ou em associação, principalmente o derivado 5-nitroimidazol como o metronidazol.^{18,19,20} No Brasil, os medicamentos mais utilizados para o tratamento da giardíase são metronidazol, tinidazol e nitazoxanida, tanto por prescrição médica quanto por automedicação.²¹ Contudo, a eficácia dos tratamentos é bastante controversa na literatura.^{18,22-30}

Todavia, não há estudos que verifiquem a regeneração da parede e o restabelecimento da homeostase intestinal após a quimioterapia giardicida sendo essa uma análise importante para o entendimento da remissão dos sintomas. O presente estudo objetivou analisar o papel das principais drogas antiparasitárias utilizadas no tratamento da giardíase na solução da enteropatia induzida pelo parasito.

Material e Métodos

Todo o protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade Integrado de Campo Mourão – PR, sob parecer de aprovação nº 369.

Para realização dessa pesquisa foram utilizados 48 camundongos Suiços machos, de 21 dias, pesando cerca de 20 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Estes animais foram mantidos no biotério da Faculdade Integrado de Campo Mourão em caixas de polipropileno (dimensão 414 x 344 x 168 mm) tampadas com grade zincada, com depósito para ração e garrafa de água, e fundo telado para evitar o contato dos animais com suas fezes e uma possível reinfecção durante o experimento. Tais caixas permaneceram em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas. Após uma semana de adaptação no biotério da Faculdade Integrado se iniciou o experimento.

Obtenção do inóculo

Os cistos de *Giardia duodenalis* utilizados neste estudo foram obtidos de amostras de fezes de pacientes atendidos no Laboratório de Parasitologia Ambiental e de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (LPAA/UEM). As amostras foram processadas pelo método de sedimentação espontânea em água e centrífugo-sedimentação com modificações, substituindo o formaldeído por água destilada. Uma gota do sedimento obtido foi analisada por microscopia óptica utilizando objetiva de 10X e 40X, 100 µL foi utilizado para extração de DNA e o restante para obtenção do inóculo a ser administrado nos animais.

O DNA foi extraído com o kit comercial *PureLink PCR Purification* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de aproximadamente 432pb do gene GDH foi amplificado em reação de seminested PCR, com modificações, com os iniciadores GDHeF: TCA ACG TYA AYC GYG GYT TCC GT, GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG e GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C.³¹ A mistura de cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 11µL, contendo tampão 10X (200mM Tris-HCL pH 8,4, 500mM KCL), 1,5mM de MgCl₂, 0,5U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen, USA), 200µM de desoxirribonucleotídeos

trifosfatados (dNTP's), 2pmol de cada iniciador (GDHeF e GDHiR na primeira reação e GDHiF e GDHiR na segunda reação), H₂O Mili-Q estéril e 2μL de DNA total. Para amplificar o gene GDH as condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos: 94°C por 45 s, 55°C 30s, 72°C por 45s, 72°C por 5 minutos, em ambas as reações.

Os produtos amplificados pelo gene GDH foram digeridos com as enzimas Nla IV and Rsa I.³¹ A enzima Nla IV é capaz de diferenciar as assemblagens de *G. duodenalis* em A1, A2, B, C, D e E, e a enzima RSA I separa em assemblagem B3 e B4. Foi utilizada neste estudo parasitos da assemblagem A2.

Os fragmentos de restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 5% corados com prata. Os cistos de *G. duodenalis* isolados foram quantificados em câmara de Neubauer, para isso foram contados os cistos presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara e multiplicado pelo fator de correção correspondente à diluição da amostra.

Obtenção dos grupos experimentais e tratamento

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos de 8 animais cada. Os animais do grupo G1 (controle negativo) recebeu por gavagem 0,5 mL e NaCl 0,85 % em dose única. Os animais dos demais grupos foram infectados, por via oral, com 1.000 cistos da assemblagem A2 de *G. duodenalis*. Os grupos infectados G3 – G6 foram tratados com antiparasitários comerciais na dosagem estabelecida pela literatura conforme descrito na Tabela 1. Os animais do grupo G2 (controle positivo) receberam por gavagem 0,5 mL de NaCl 0,85%.

Confirmação e acompanhamento de infecção

Uma semana após a infecção, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais durante duas horas para a coleta das fezes, as quais foram utilizadas para pesquisa parasitológica por meio da técnica de Faust.³² Este procedimento foi realizado em todos os animais, em dias alternados, até a confirmação da infecção. Alíquotas do material fecal dos animais foram analisadas por meio das técnicas de biologia molecular anteriormente descritas para determinação da assemblagem.

Eutanásia e Coleta de Amostras

Aos 45 dias após a infecção (dpi), os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com vapor de halotano.³³ Após laparotomia vertical, o duodeno foi retirado, tendo como limite anatômico distal a flexura duodeno-jejunal, e processado para análise histológica.

Processamento Histológico

Foram coletados de todos os animais anéis de dois centímetros do duodeno proximal e fixados em Bouin por 6 horas. Foram emblocados em parafina para obtenção de cortes transversais semi-seriados de 4µm, feitos em micrótomo e dispostos em lâminas de vidro. Esses cortes passaram por baterias de desparafinização e hidratação para serem corados com hematoxilina e eosina (HE) – utilizada na morfometria dos vilos, das criptas, dos enterócitos, na quantificação de linfócitos intraepiteliais (LIE), células de paneth e na morfometria da tela submucosa, túnica muscular e parede total. Foram confeccionadas também lâminas com as colorações de PAS (periodic acid shiff) – para detecção de mucinas neutras e sialomucinas lábeis (PAS+); Alcian-Blue pH 2,5 – para detecção de sialomucinas e sulfomucinas (AB 2,5+); e Alcian-Blue pH 1,0 (AB 1,0+) – para detecção de sulfomucinas. Todas as análises foram feitas de forma cega.

Análise do epitélio do duodeno

Análise morfométrica de enterócitos

Foram mensuradas a largura e a altura de 50 enterócitos e o menor e maior diâmetro dos seus núcleos presentes aleatoriamente nos vilos e nas criptas de cada animal. Para isso, foram capturadas na objetiva de 40x quatro imagens de cada corte, com auxílio de uma câmera digital (Pro series 3CCD câmera) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX50). As mensurações de largura e altura dos enterócitos e seus núcleos foram feitas no software de análise de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics).

Contagem de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais

Para cada uma das técnicas de PAS, AB 1,0 e AB 2,5 foram corados quatro cortes, e contadas 2500 células do epitélio da túnica mucosa de cada animal, sempre analisando a metade esquerda do vilos, com auxílio da objetiva de 40x do microscópio óptico (Olympus BX50). Em cada uma dessas técnicas, foi quantificado o número de células caliciformes presentes e calculadas a proporção de células caliciformes/100 células epiteliais. O mesmo se repetiu para LIE.

Contagem de células de Paneth

Cada corte foi dividido em quatro quadrantes sendo contadas as células de Paneth presentes na base de quatro criptas de cada quadrante, totalizando 64 criptas por animal.

Análise morfométrica da parede intestinal

Imagens capturadas na objetiva de 4x foram utilizadas para medir a largura e a altura dos vilos e profundidade e largura das criptas em seus pontos médios. Imagens obtidas na objetiva de 10x foram utilizadas para a mensuração da tela submucosa e da túnica muscular. Imagens capturadas na objetiva de 4x também foram utilizadas para medir a espessura total da parede, tendo como base a túnica serosa até a base do vilos. Foram obtidas quatro imagens de cada um dos quatro cortes. Através do software de análise de imagens *Image Pro Plus* (Media Cybernetics) foram obtidas 16 medidas por animal, para cada parâmetro da parede intestinal avaliado.

Análise estatística

A análise estatística foi feita no programa Bioestat 5.3. Os testes foram definidos por meio do teste de normalidade D'Agostino-Pearson que verificou a distribuição dos dados. Todos os dados apresentaram distribuição normal, e por isso foram apresentados pela média \pm desvio padrão e aplicados o teste de variância Anova-um critério seguido do pós-teste T de Student. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Os enterócitos e seus respectivos núcleos aumentaram nos animais infectados e tratados em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$). (Tabela 2). Foi evidenciado um aumento significativo de células caliciformes marcadas pelas técnicas de PAS, AB 1,0 e AB 2,5 em todos os grupos, quando comparados com o G1, sendo o menor aumento evidenciado

em G5. O mesmo resultado repetiu-se na quantificação de LIE (exceto para G5) e células de Paneth ($p < 0,05$) (Tabela 3; Figuras 2 e 3).

Na análise de vilo e cripta, nos vilos de todos os grupos em comparação ao G1, apresentaram redução da altura e aumento da largura ($p < 0,05$), enquanto que nas criptas apresentaram aumento na profundidade e largura em todos os grupos em relação ao G1 ($p < 0,05$). O G5 foi o grupo que apresentou menor alteração nos vilos e nas criptas ($p < 0,05$) (Figura 1).

Na morfometria da parede intestinal, observou-se hipertrofia em todos os grupos. Todos esses resultados quando comparados ao G1 ($p < 0,05$) (Tabela 4, Figura 4).

Discussão

Esta pesquisa demonstrou que na infecção causada por *Giardia duodenalis* pode ocorrer mudanças morfológicas na parede e em células do epitélio do revestimento interno do duodeno de camundongos suíços.

Diversas alterações foram observadas no epitélio como a hipertrofia dos enterócitos e seus núcleos. Esse aumento pode ser um indicativo morfológico do processo de apoptose, como já descrito.^{17,34} Hipertrofias semelhantes foram encontradas no duodeno de ratos e de crianças infectadas por *G. duodenalis*.^{17,35} Neste estudo, demonstramos que os antiparasitários não preveniram essa modificação morfométrica, mantendo a possível alteração funcional e comprometendo todo o epitélio duodenal. Os enterócitos são as células mais numerosas deste epitélio, tem o papel absorptivo e alterações podem indicar comprometimento da função do órgão como um todo.³⁶

É interessante ressaltar que mesmo com o uso do metronidazol que levou a eliminação total dos parasitos e o intervalo de 30 dias de cura não foi observado o reestabelecimento destas células epiteliais.³⁷

O aumento de células caliciformes em todos os grupos infectados e com as três técnicas empregadas, reflete a demanda por uma maior secreção de mucinas, possivelmente na tentativa de formar uma camada de muco mais espessa para proteger o epitélio do parasito e de infecções secundárias.³⁸ As células caliciformes são responsáveis pela produção das mucinas precursoras de muco intestinal que tem a função de proteger o epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos. Dentre as mucinas secretadas pelas células caliciformes, as neutras (PAS+) conferem maior densidade, enquanto que as mucinas ácidas (AB+) conferem mais fluidez ao muco.^{39,40} O aumento do número de células caliciformes também foi encontrado em cães, ratos, camundongos, gerbios e crianças infectadas por *G. duodenalis* reforçando a necessidade de proteção do epitélio intestinal diante da invasão visando impedir sua fixação ou expulsar o parasito.^{41,11,12,42,43} As células caliciformes PAS+ aumentaram em média 28% nos animais infectados. O tratamento com os antiparasitários não corrigiu esta modificação epitelial apesar do metronidazol, em comparação com os demais fármacos induzir um aumento menor, de 18% ($p > 0,05$). Merece destaque a proporção do aumento de células produtoras de mucinas ácidas de 326% (AB 1,0) e 165% (AB 2,5) nos animais infectados e não tratados. Da mesma forma, o metronidazol não corrigiu o maior número de células, mas promoveu um aumento reduzido de 52% (AB 1,0) e de 62% (AB 2,5), mostrando-se o mais eficiente na evolução em direção a normalidade. Todavia, a composição química do muco permaneceu alterada comprometendo possivelmente suas funções. Durante a infecção por *G. duodenalis* a hiperplasia de células caliciformes pode ser prejudicial a barreira epitelial, dando origem a portões que permitem a invasão do parasito no tecido.⁴²

A infecção promoveu também um aumento significativo no número de LIE de (159%) nos animais não tratados. Apenas o tratamento com metronidazol (G5) reestabeleceu o índice de LIE/ por células epiteliais, quando comparado ao controle (G1). O acúmulo de leucócitos na mucosa intestinal é uma característica histopatológica dos processos

inflamatórios do sistema digestório. Os LIEs pela proximidade com a superfície mucosa parecem exercer papel inicial na resposta imunitária. Essas células possuem características que facilitam suas funções, como sobrevivência seletiva, proliferação local e retenção de subpopulações no epitélio. Na presença de inflamação mucosa a proporção de LIEs se altera.^{44,45} Aumentos de LIE foram observados também em infecções experimentais com ratos, camundongos e bezerros, e ainda em biópsia de humanos, apontando a ação de processos imunológicos locais visando aumentar a defesa dos animais frente à infecção.^{46,15,16}

Neste estudo, os animais tratados com metronidazol (G5) apresentaram normalidade no número de LIE quando comparados ao controle. A permanência dessas alterações nos animais tratados pelos demais antiparasitários pode ser uma resposta à persistência do parasito no local que não houve completa eliminação da *G. duodenalis* e sua possível proliferação. O quimioterápico metronidazol exerce também o papel imunomodulador o que pode ter ampliado sua ação específica sobre os IELs.^{37,21,47}

As células de Paneth, desempenham um papel primordial na defesa local por produzir defensinas giardicidas.³⁶ Os animais infectados por *G. duodenalis* tiveram 71% mais células de Paneth do que os controle. A agressão promovida pelo protozoário promove o aumento do número e a ativação dessas células visando a lise do parasito e o controle da infecção. Estudos anteriores também evidenciaram esse aumento da ação e/ou número de Paneth *in vitro e in vivo*, ressaltando a importância das defensinas e inclusive seu possível uso futuro como medicamento giardicida.^{13,14}

Neste estudo após 30 dias transcorridos do término do tratamento com os antiparasitários nenhum grupo havia reestabelecido a proporção de células de Paneth observadas nos animais não infectados do G1. Quando os grupos tratados são comparados entre si verifica-se o menor aumento no número destas células ($p < 0,05$) nos animais tratados pelo metronidazol (aumento de 37,5%).

A clássica descrição histopatológica da giardíase inclui a atrofia de vilosidades, inflamação crônica da mucosa e hiperplasia da cripta que em conjunto responderia pela má absorção e diarreia.^{48,49} Neste experimento também foi observada diminuição na altura dos vilos, que pode indicar uma redução na superfície de contato do epitélio com a luz intestinal como mecanismo de proteção. O aumento na largura dos vilos dos animais infectados ainda pode ser explicado pelo aumento da resposta imunológica frente à presença do parasito levando a um processo inflamatório mediados principalmente por eosinófilos e outros leucócitos.⁴⁵ Os antiparasitários empregados neste estudo não promoveram o reestabelecimento da normalidade na altura dos vilos. Quando comparados entre si o metronidazol levou ao menor comprometimento nos animais de G5 ($p < 0,05$). A largura dos vilos permaneceu aumentada nos animais tratados com nitazoxanita, albendazol e secnidazol e foi reestabelecida com o tratamento pelo metronidazol ($p < 0,05$).

Acreditamos que a normalização da largura do vilos reflita o controle do processo inflamatório local e redução da migração leucocitária o que é reforçado pela normalização na proporção dos LIEs apresentados acima.

O aumento na largura das criptas e as alterações na sua profundidade podem ser explicados pela possível necessidade de reequilíbrio do epitélio intestinal em resposta a presença do parasito e suas possíveis agressões a mucosa. As criptas são um sítio contínuo de renovação e proliferação celular.⁵⁰ Neste estudo as alterações permaneceram em todos os grupos tratados ($p < 0,05$). A profundidade das criptas dos animais tratados pelo metronidazol e albendazol demonstraram menor alteração do que os demais tratamentos ($p < 0,05$) mostrando tendência a normalização.

Por fim as camadas da parede intestinal do duodeno hipertrofiaram em todos os grupos ($p < 0,05$), possivelmente por que durante a inflamação as células da parede intestinal aumentam sua interação com as do sistema imune e sua exposição às citocinas, o que pode

alterar seu metabolismo deixando-as hiper ou hipotróficas.⁵¹ Este é o primeiro trabalho a analisar as camadas intestinais separadamente em animais infectados por *G. duodenalis*.

Em suma, os nossos resultados sugerem que a infecção por *Giardia duodenalis* causa enteropatia, caracterizada pela redução na altura e aumento na largura dos vilos, aumento na altura e largura das criptas, aumento do tamanho dos enterócitos assim como seus núcleos, aumento de células caliciformes que secretam mucinas neutras e básicas, no número de LIEs, células de Paneth e hipertrofia das camadas da parede intestinal. Quanto aos antiparasitários testados, todos minimizaram a enteropatia causada pela infecção, porém, o medicamento que obteve maior eficiência foi o metronidazol.

Sugere-se que a eficácia do tratamento da giardíase envolva não só o acompanhamento da eliminação de parasitos nas fezes, mas também a regularização das funções intestinais. Em imunodeprimidos ou infecções recorrentes pode ser necessária a análise histológica intestinal e tratamento visando o controle da inflamação.

Referências

1. Pallant L, Barutzki D, Schaper R, Thompson RC, 2015. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors*. 6:8 1-2.
2. Feng Y, Xiao L, 2011. Zoonotic potencial and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. In (Ed). *Clinica Microbiology Reviews*. 24: 110-40.
3. Karanis P, Kourenti C, Smith H, 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Heath*. 5: 1-38.
4. Baldursson S, Karanis P, 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites worldwide review of outbreaks – an update 2004 – 2010. *Water Research*. 45 : 6603-14.
5. Savioli L, Smith H, Thompson A, 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative” *Trends in Parasitology*. 22: 203-8.
6. Hellard FP, Sinclair ML, Hogg GG, Fairley CK, 2000. Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 15: 290-3.
7. Pupulin ART, Gomes ML, Dias MLG, Araujo SM, 2004. Giardiasis in daycare centres at Maringa, PR. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 36: 147-149.
8. Eligio G, Cortes C, Jimenes C, 2008. Classification of *Giardia intestinalis* isolates by multiple polimerase chain reaction (multiplex). *Parasitology Research*. 103: 797-800.
9. Muller N, Allmen N, 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology*. 35: 1339–1347.

10. Bartelt AL, Roche J, Kolling G, Bolick D, Noronha F, Naylor C, Hoffman N, Warren C, Singer S, 2013. Guerrant r. Persistent *G. lamblia* impairs growth in a murine malnutrition model. *The Journal of Clinical Investigation*. 123, n. 6.
11. Shukla G, Sidhu RK, Verma A, 2012. Restoration of anthropometric, biochemical and histopathological alterations by *Lactobacillus casei* supplementation in *Giardia intestinalis* infected renourished BALB/c mice. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 102 : 61–72.
12. Ventura LLA, Oliveira DR, Viana JC, Santos JF, Calliarim V, Gomes MA, 2013. impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology*. 133:391–395.
13. Tako EA, Hassimi MF, Li E, Singer SM, 2013. Transcriptomic analysis of the host response to *Giardia duodenalis* infection reveals redundant mechanisms for parasite control. *MBio*. 4(6): 660-13.
14. Eckmann L, 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite immunology*. 25(5): 259-79.
15. Arevalo F, 2010. Duodenal villous atrophy, an unexpectedly common finding in *Giardia lamblia* infestation. *Revista de gastroenterología del Perú : órgano oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú*. 30(4): 272-76.
16. Mohammad KA, Koshak EA, 2013. A prospective study on parasites among expatriate workers in Al-Baha from 2009-2011, Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 41(2): 423-432.
17. Yu LCH, Huang CY, Kuo WT, Sayer H, Turner JR, Buret AG, 2008. SGLT-1-mediated glucose uptake protects human intestinal epithelial cells against *Giardia duodenalis*-induced apoptosis. *Int J Parasitol*. 38, n. 8-9: 923–934.

18. Teles NSB. Avaliação da eficácia terapêutica da *Mentha crispa* no tratamento da giardíase. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 163 p. 2008.
19. Rey, L. Bases da Parasitologia Médica. 4ª. edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. 2011.
20. Neiva VA, Maria NSR, Flavia RFN, 2014. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-*Giardia* activity. Revista Brasileira de Farmacognósia. 24 : 215-224.
21. Venturini CD, Engrof P, Ely LS, Tasca T, Cart GA, 2014. Interações entre Antiparasitários e Alimentos. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 35, n.1: 17-23.
22. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em cores*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2013.
23. Upcroft P, Upcroft JA, 2001. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. Clinical Microbiology Reviews. 14, n. 1: 150-164.
24. Arguello GR, CRUZ SM, ROMERO ML, ORTEGA PG, 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy. 54: 711-721.
25. Balteiro AJD. Indução de resistência ao metronidazol e albendazol em *Giardia lamblia*. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Curso de Toxicologia, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. Aveiro. Portugal. 126 p. 2006.
26. Busatti HGNO. Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Curso de Parasitologia,

- Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 63 p. 2006.
27. Rossignol JF, 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Experimental parasitology*. 124 (1): 45 - 53.
 28. Bailey C, Lopez S, Camero A, Taiquiri C, Arthuary Y, Moore DA, 2013. Factors associated with parasitic infection amongst street children in orphanages across Lima, Peru. *Pathogens and global health*. 107, n. 2: 52-7.
 29. Pérez RA, Hernandez JM, Castilio RA, Yopez ML, Castilio R, Hernandez LF, Noqueda TB, Luna AJP, Radilla G, Leon AG, 2013. Albendazole and its derivative JVG9 induce encystation on *Giardia intestinalis* trophozoites. *Parasitology research*. 112, n. 9: 3251-7.
 30. Shukla G, Klaur H, Sharma L, 2013. Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. *Parasitology research*. 112, n.6: 2143-9.
 31. Read CM, Monis PT, Thompson RCA, 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*.4:125-130.
 32. Faust EC, D'antoni JS, Odom V, Miller M J, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH, 1938. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18: 169-183.
 33. Vivas LAM, Jamel N, Refinetti RA, 2007. Anesthetic experimental device for small animal. *Ac Cirq Bras*. 22:229-23.

34. Alberts B, Johnson A, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Nova Iorque: Garland Sciences. 2004.
35. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD, 2013. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*. 56(3): 328-35.
36. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em cores*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan. 2013.
37. Pavanelli M.F, Silva AMG. Resistência Medicamentosa e Sinais Clínicos da Infecção pela Assemblagem A de *Giardia intestinalis* em camundongos swiss. Trabalho acadêmico. Faculdade Integrado de Campo Mourão (Graduação em Farmácia). 12 folhas. 2013.
38. Myers BM, 2008. Carbohydrates. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. Philadelphia: Elsevier 161-187.
39. Beamish, RJ 1972. Lethal pH for white sucker *Catostomus comersoni* (Lacépède). *Transact Am Fish Societ*. 101:335-358.
40. Zieske JD, Bernstein IA, 1982. Modification of cell surface glycoprotein: addition of fucosyl residues during epidermal differentiation. *J Cell Biol*. 95: 626-631.
41. Hensel KO, Boland V, Postberg J, Zilbauer M, Heuschkel R, Vogel S, Gödde D, Wirth S, Jenke AC, 2014. Differential expression of mucosal trefoil factors and mucins in pediatric inflammatory bowel diseases. *Scientific reports*. 5(4):7343.
42. Macotela MP, Gonzalez MA, Reunoso RR, Martinez GMN, 2008. Goblet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? *Parasitol Res*.102: 509–513.

43. Mokrzycka M, Kolasa A, Kosierkiewicz A, Wiszniewska B, 2010. Inducible Nitric Oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 48, n. 2:191-196.
44. Elia CCS, Souza HSP. *Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito*. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu. 2001.
45. Abbas AK, Kumar V, Mitchell RN. *Fundamentos de Patologia – Robbins & Cotran*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier. 2012.
46. Ruest N, Couture Y, Faubert GM, Girard C, 1997. Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Veterinary parasitology*. 69(3-4):177-86.
47. Basso MP; Christiano AB; Marciano MR; Cunrath GR; Netinho JG, 2011. Comparison of effect of topical metronidazole 10% associated with nifedipine 0.3% versus nifedipine 0.3% alone in postoperative hemorrhoidectomy by hybrid technique. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 31 n. 2: 131-138.
48. Mascarini LM; Donalísio MR, 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in children institutionalized at daycare centers in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39 n. 6: 577-579.
49. Koot BG; Kate FJ; Juffrie M; Rosalina I; Taminiu JJ; Benninga MA, 2009. Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 49: 304-308.
50. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.2013.

51. Mawe GM, Collins SM, Shea-DT, 2004. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol Motil.* 16:133-136.
52. Cruz CCP, Ferrari L, Sogayar R, 1997. Ensaio Terapêutico na Infecção por *Giardiamuris* em Camundongo com Metronidazole, Tinidazole, Secnidazole e Furazolidone. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 30, n. 3: 223-228.
53. Reynoldson JA, Thompson RCA, MELONI BP, 1991. In Vivo Efficacy of Albendazole against *Giardia duodenalis* in mice. *Parasitology Research.* 77: 325-328.

Tabela 1 - Antiparasitários e esquemas terapêuticos utilizados no tratamento de camundongos infectados pela *G. duodenalis*.

Grupo	Tratamento	Esquema terapêutico
G3	Nitazoxanida	10 mg/kg – 2x ao dia durante 3 dias ^c
G4	Albendazol	4 mg/dia durante 5 dias ^b
G5	Metronidazol	500 mg/kg – 3x ao dia durante 7 dias ^a
G6	Secnidazol	200 mg/kg – dose única ^a

Fonte: a: CRUZ, FERRARI e SOGAYAR, 1997.⁵²

b: REYNOLDSON, THOMPSON e MELONI, 1991.⁵³

c: TELES, 2008.¹⁸

Tabela 2 - Altura e largura de enterócitos e maior e menor diâmetro de seus núcleos presentes na mucosa duodenal de camundongos suíços infectados pela *G. duodenalis* e tratados com antiparasitários.

Grupos	Enterócito		Núcleo	
	Altura (µm)	Largura (µm)	> Diâmetro (µm)	< Diâmetro (µm)
G1	14,79 ± 2,98 ^a	5,51 ± 1,47 ^a	6,52 ± 1,63 ^a	4,37 ± 0,88 ^a
G2	17,56 ± 3,97 ^{ab}	6,95 ± 1,09 ^{ab}	7,89 ± 1,65 ^{ab}	5,97 ± 1,08 ^{ab}
G3	16,36 ± 3,11 ^{abc}	6,63 ± 1,12 ^{ac}	7,16 ± 1,32 ^{ac}	5,78 ± 1,02 ^{ac}
G4	17,04 ± 3,87 ^{acd}	6,17 ± 1,36 ^{ad}	7,44 ± 1,84 ^{ad}	5,32 ± 1,19 ^{ad}
G5	16,19 ± 3,63 ^{abe}	6,12 ± 1,26 ^{ae}	7,37 ± 1,57 ^{ae}	5,38 ± 1,07 ^{ae}
G6	15,50 ± 3,50 ^{abcdef}	6,22 ± 1,16 ^{af}	7,32 ± 1,82 ^{af}	5,31 ± 1,0 ^{af}

Média ± desvio padrão seguidas de letras iguais numa mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Análise de Variância ANOVA, teste *t*.

Tabela 3 - Células caliciformes e linfócitos intraepiteliais / 100 células epiteliais e células de Paneth no duodeno de camundongos suíços infectados pela *G. duodenalis* e tratados com antiparasitários.

Grupos	Células caliciformes / 100 células epiteliais			LIE	PANETH
	PAS+	AB 1,0+	AB 2,5+		
G1	7,04 ± 0,36 ^a	0,80 ± 0,38 ^a	1,16 ± 0,42 ^a	2,14 ± 0,47 ^a	48 ± 4,63 ^a
G2	9,05 ± 0,79 ^{ab}	3,41 ± 0,38 ^{ab}	3,08 ± 0,46 ^{ab}	5,56 ± 1,85 ^{ab}	82,14 ± 17,10 ^{ab}
G3	8,54 ± 1,08 ^{ac}	2,66 ± 0,5 ^{abc}	2,85 ± 0,56 ^{ac}	3,21 ± 0,53 ^{abc}	71,71 ± 5,15 ^{ac}
G4	8,42 ± 1,07 ^{ad}	2,70 ± 0,19 ^{abd}	2,49 ± 0,45 ^{abcd}	4,27 ± 0,61 ^{abcd}	81,25 ± 15,45 ^{acd}
G5	8,36 ± 0,71 ^{ae}	1,22 ± 0,13 ^{abcde}	1,89 ± 0,27 ^{abcde}	2,73 ± 0,76 ^{bef}	66 ± 10,14 ^{abde}
G6	8,39 ± 0,79 ^{af}	2,38 ± 0,33 ^{abef}	2,34 ± 0,42 ^{abcdef}	3,19 ± 0,77 ^{abdf}	76,75 ± 15,35 ^{af}

Média ± desvio padrão seguidas de letras iguais numa mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Análise de Variância ANOVA, teste *t*. PAS+ (Periodic Acid Schiff). AB 1,0+ e AB 2,5+ (Alcian-Blue).

Tabela 4 - Morfometria da tela submucosa, da túnica muscular e da parede total do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), evidenciados pela coloração de HE

Grupos	Túnica Mucosa	Tela Submucosa	Túnica Muscular	Parede Total
G1	37,08 ± 5,86 ^a	12,07 ± 1,22 ^a	30,36 ± 4,47 ^a	176,24 ± 35,73 ^a
G2	56,62 ± 8,08 ^{ab}	29,56 ± 5,68 ^{ab}	54,53 ± 4,30 ^{ab}	260,46 ± 41,78 ^{ab}
G3	40,34 ± 4,89 ^{abc}	16,01 ± 4,39 ^{abc}	38,24 ± 5,12 ^{abc}	188,90 ± 30,27 ^{abc}
G4	50,54 ± 4,83 ^{abcd}	19,54 ± 5,55 ^{abcd}	49,29 ± 10,63 ^{abcd}	184,65 ± 27,20 ^{abcd}
G5	41,11 ± 8,89 ^{abcde}	20,31 ± 5,83 ^{abce}	49,85 ± 4,54 ^{abce}	180,63 ± 26,29 ^{abcde}
G6	42,76 ± 10,06 ^{abcdef}	13,95 ± 4,74 ^{abcdef}	34,64 ± 5,63 ^{abcdef}	186,74 ± 24,95 ^{abcef}

Média ± desvio padrão seguidas de letras iguais numa mesma coluna apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Análise de Variância ANOVA, teste *t*.

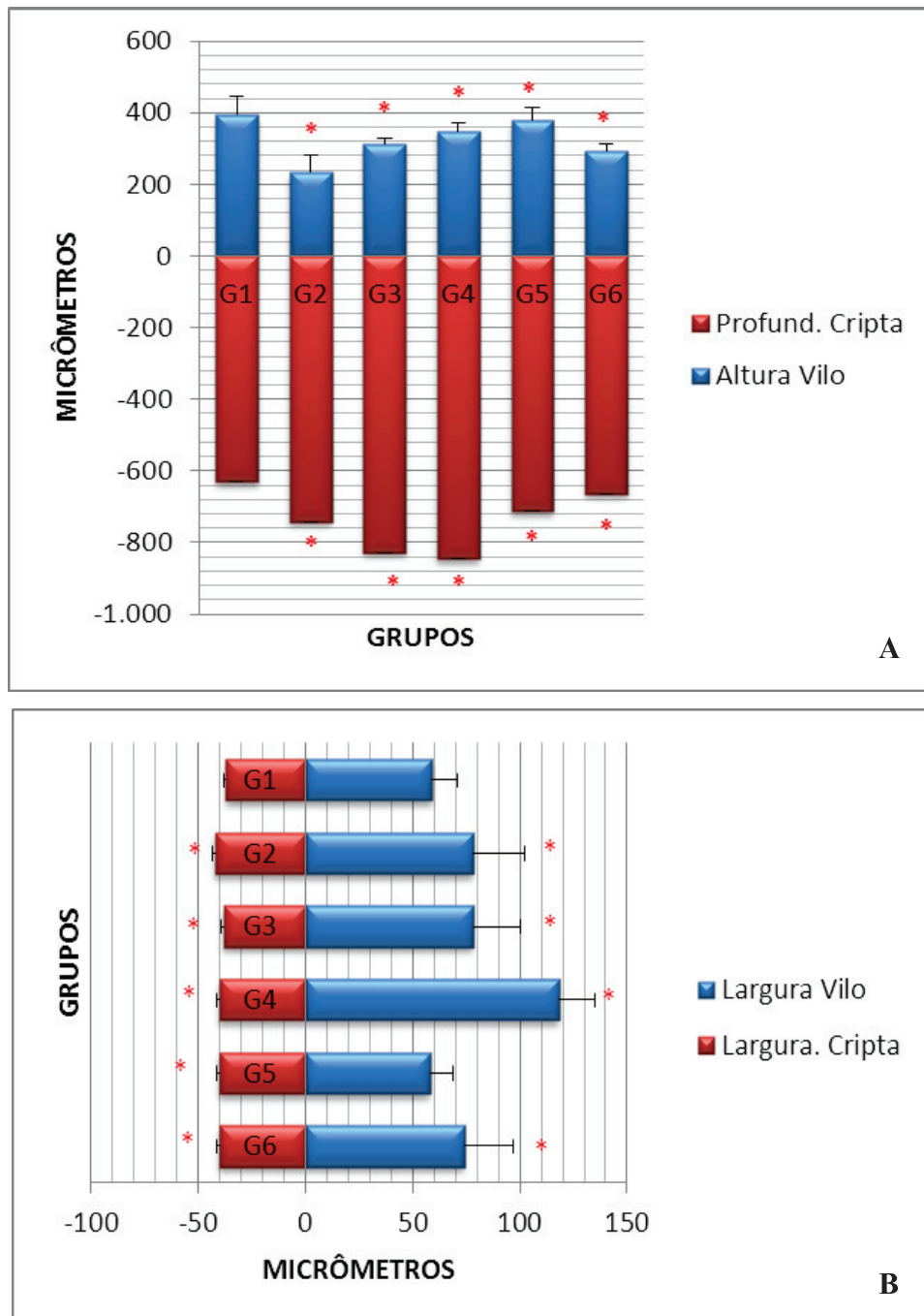


Figura 1 - (A) Altura dos vilos e profundidade das criptas; (B) largura dos vilos e das criptas, do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), evidenciados pela coloração de HE. A diferença estatística com o G1 é representada pelo * ($p < 0,05$).

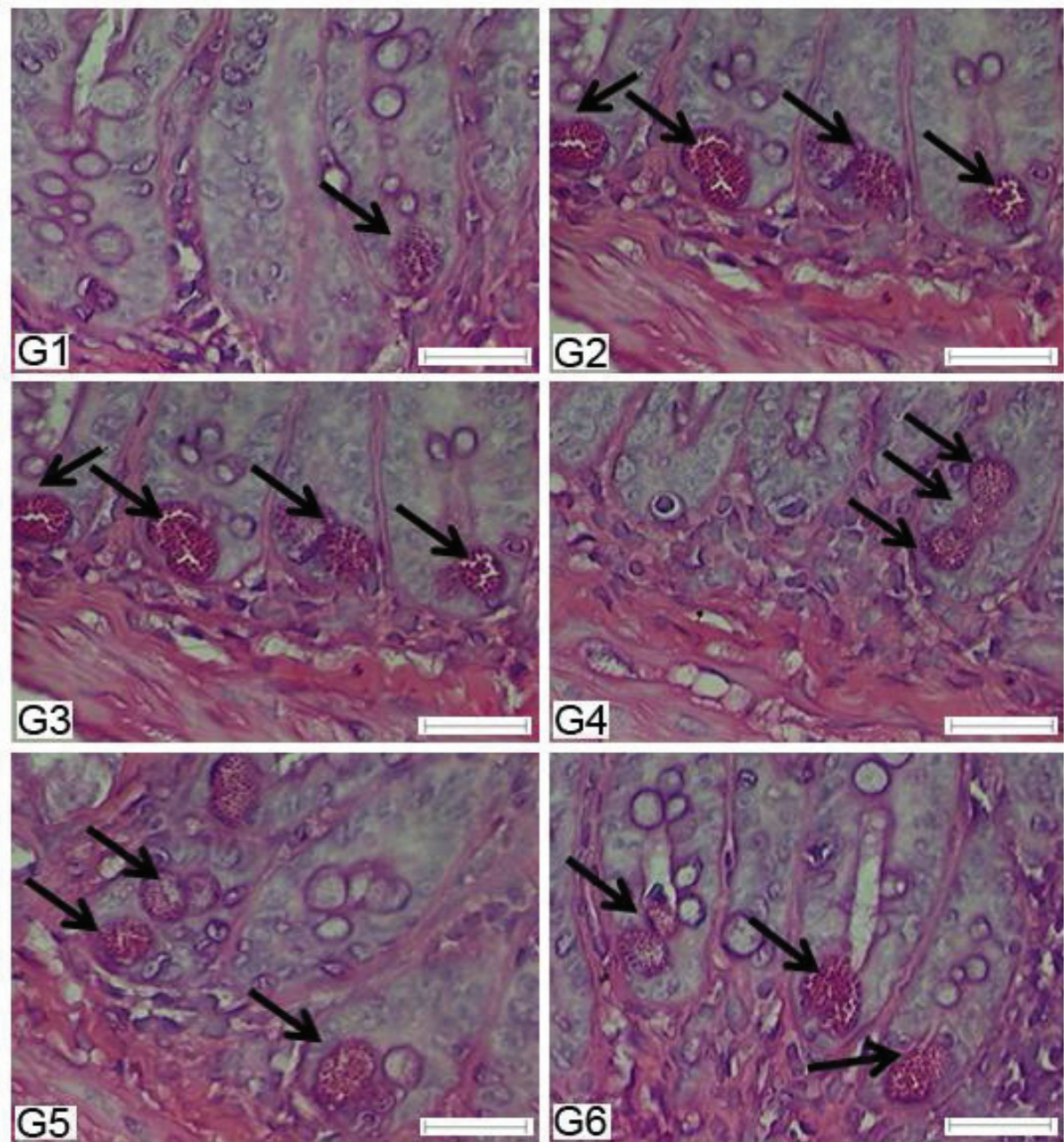


Figura 2 - Micrografia de cortes transversais do duodeno de camundongos dos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) evidenciados pela coloração de HE. As setas demonstram células de paneth, sendo possível observar aumento dessas células no grupo infectado e nos diferentes tratamentos. Aumento de 400x, barra: 20 μ m.

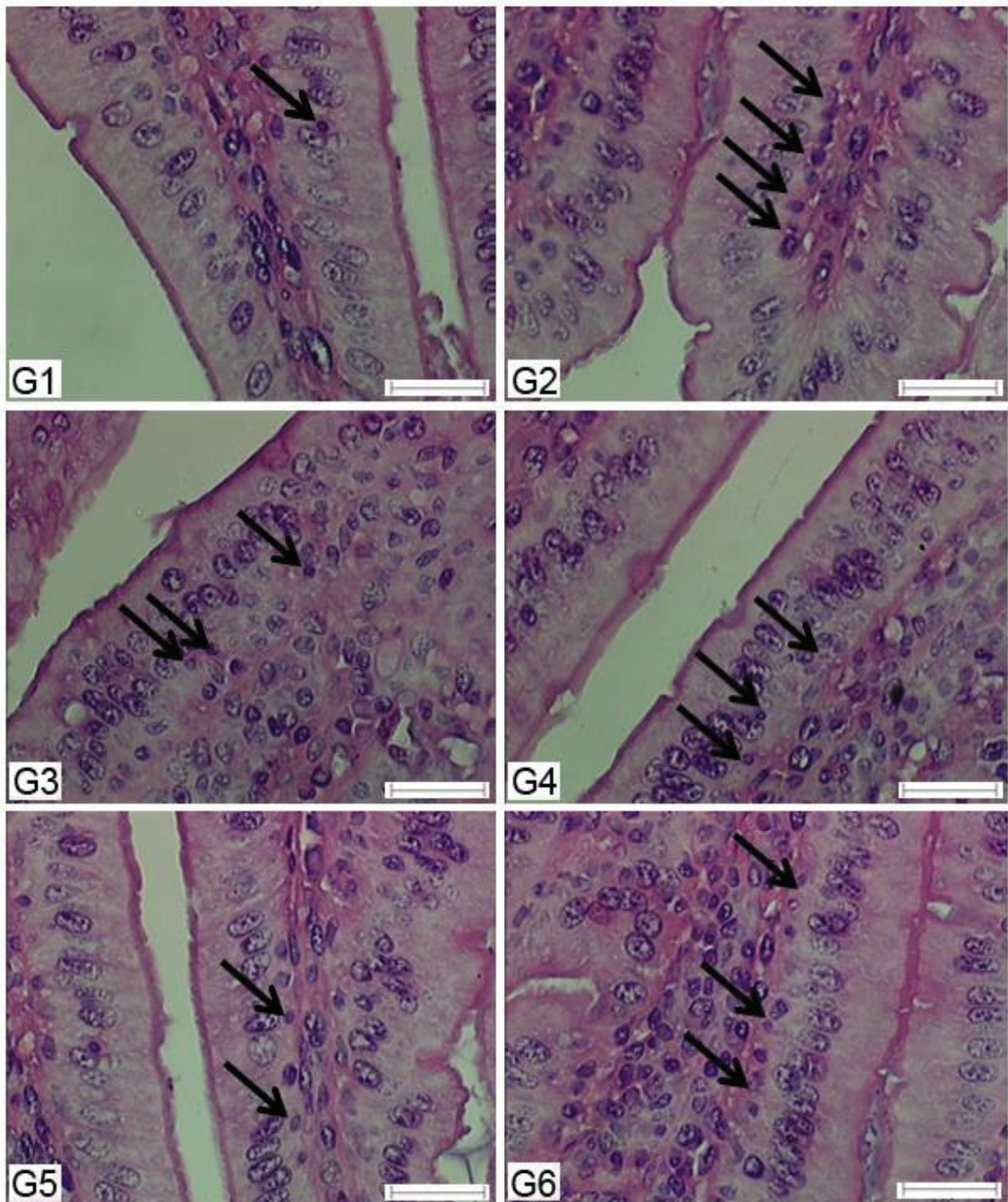


Figura 3 - Micrografia de cortes transversais do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) evidenciados pela coloração de HE. As setas demonstram linfócitos intra epiteliais, sendo possível observar aumento dessas células no grupo infectado e nos diferentes tratamentos. Aumento de 400x, barra: 20 μ m.

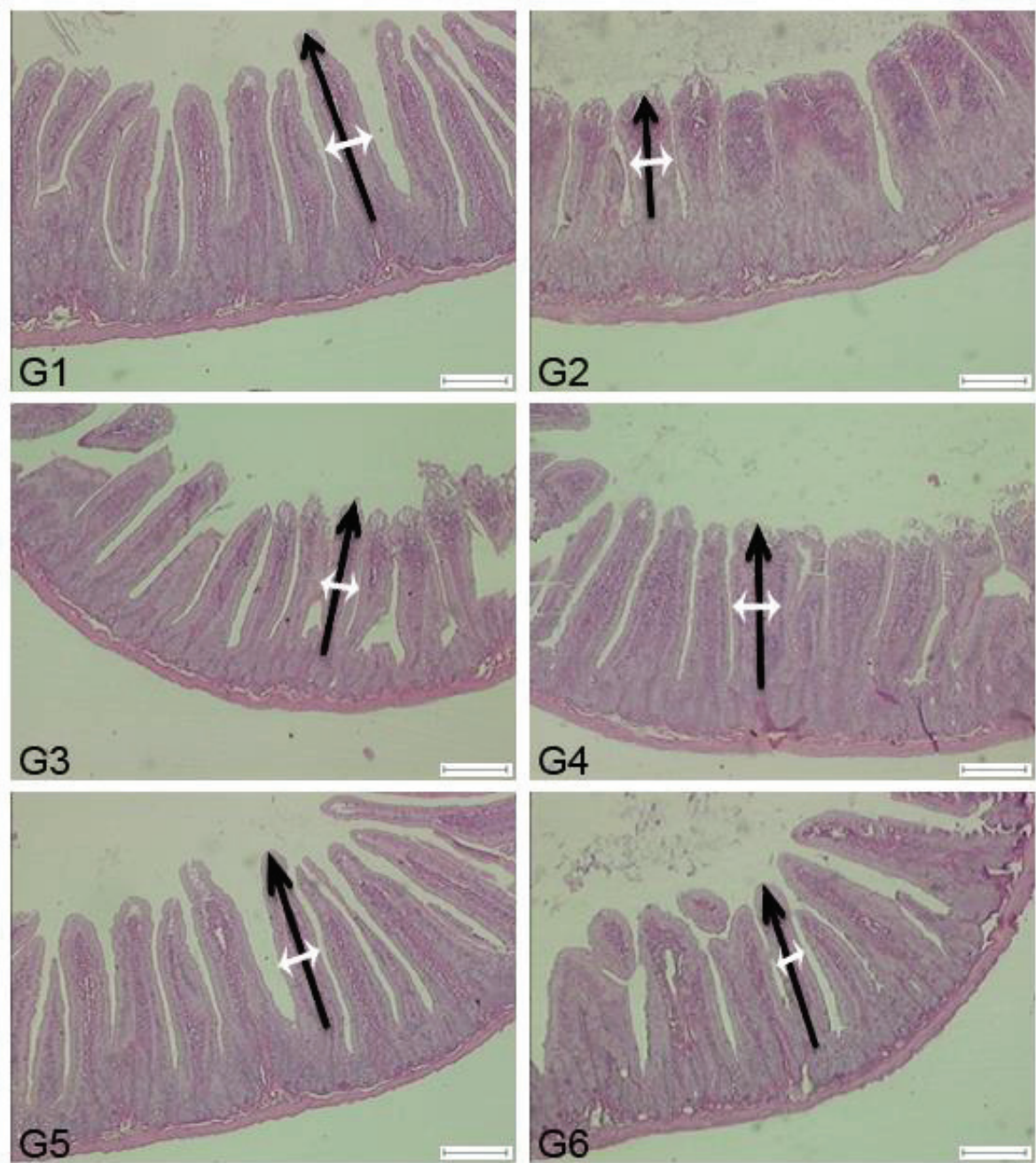


Figura 4 - Micrografia de cortes transversais do duodeno de camundongos nos grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) evidenciados pela coloração de HE. Sendo possível observar diminuição na altura dos vilos e aumento da largura dos vilos, profundidade e largura das criptas em relação ao controle. Aumento de 100x, barra: 50 μ m.

ANEXOS

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Instructions for Authors

The AJTMH publishes a broad range of papers covering topics in tropical medicine. Authors uncertain about the appropriateness of a manuscript for the Journal are encouraged to review recent issues of the Journal and to contact editorial staff with any questions. Manuscripts and correspondence should be submitted at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>. Questions about the submission process can be directed to the AJTMH editorial office cbs15@case.edu. Technical support questions should be sent to support@scholarone.com. Cover Letter and Signatures. All manuscripts should be accompanied by a cover letter with the following information:

- The title of the paper
- A brief description of the significance of the paper to the readers of the AJTMH
- A statement confirming that the material is original, has not already been published, and has not and will not be submitted for publication elsewhere as long as it is under consideration by the AJTMH
- Written disclosure of any relationships or support which might be perceived as constituting a conflict of interest
- Names and signatures of all contributing authors accompanied by a statement indicating that they have participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions of the manuscript. Electronic signatures and multiple copies of the letter to facilitate gathering of signatures are acceptable, but it is preferable to submit signatures in one batch
- The corresponding author must sign and return the copyright form (available at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>) upon submission.

Authorship. There is no limit to the number of authors that may be listed (except for Images in Clinical Tropical Medicine articles; see below), but only those individuals who contributed substantially to the manuscript should be authors. The AJTMH adheres to standard of authorship as described in the following link: http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011.pdf. In some cases, for papers with a large number of authors participating in a

working group, the group may be cited as author, and all individual authors listed in a footnote.

MANUSCRIPT TYPES

Original research reports. These form the large majority of papers published by the AJTMH and consist of reports of novel research. There is no word limit or limit to the number of references, but efforts should be made to keep manuscripts as succinct as possible. Full reports should include separate sections entitled Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion; the last two sections can be combined. The abstract should not include sub-headings and should contain no more than 200 words. The following sections should be included after the text: Acknowledgments, Financial Support, and Disclosures regarding real or perceived conflicts of interest. Manuscripts should end with a listing of all authors' current addresses, including affiliation, city, country, and email address, followed by References (see Reference section below).

Short reports. This format can be used for submission of important preliminary observations, technique modifications, or data that do not warrant publication as a full paper. Short reports should contain no sub-headings, and be no more than 1500 words in length, with no more than 150 words in the abstract, 3 tables and/or figures, and 20 references

Reviews. The AJTMH will consider reviews on relevant topics in tropical medicine, global health, and related areas. Typically reviews will be submitted by leading authorities in a field. Reviews may be solicited by the editors. Alternatively, for unsolicited reviews, prospective authors are asked to send a presubmission letter to the Journal (cbs15@case.edu) for consideration of their proposed topic before submission. We encourage mini-reviews, providing concise reviews of focused topics in no more than 2000 words, but larger reviews will also be considered.

Perspectives: These are short articles (up to 1500 words) on timely topics that offer both a focused review of the subject and a balanced presentation of issues that may include key recent changes or areas of controversy. Perspectives may offer the opinions of authoritative experts on timely topics or personal accounts from those with compelling tropical medicine experiences. As with reviews, some Perspectives may be solicited, and for unsolicited manuscripts a presubmission letter should be sent to the Journal (cbs15@case.edu) for consideration of the proposed topic before submission.

Case reports. Short reports of no more than 1500 words can describe a single case or small case series. These must present novel information about a tropical medicine problem of broad interest. Case reports should include an Introduction offering a succinct description of the

area, a Case Report section including only clinical information that is relevant to the manuscript, and a brief Discussion.

Images in Clinical Tropical Medicine. Short reports (typically up to 200 words, but up to 400 words if complex descriptions are needed, with 5 references and no abstract) including images that demonstrate particularly informative, striking, or unusual presentations of tropical disease are welcome. Manuscripts that offer visual immediacy and clinical relevance will be prioritized. Images will be published in black and white in the print version of the Journal (author will have the option to pay for color) and in color online. Images articles should have no more than 3 authors.

Book Reviews. These are occasionally solicited by the editors. They should have no sub-headings and be no more than 1000 words in length.

Letters to the Editor. Letters are uncommonly published and should only be responses to recently published articles in the AJTMH. If letters are deemed worthy of publication, they will typically be sent to the authors of the published paper for a response.

Submission process. Prepare your manuscript using a word processing program and save it as a .doc file using Microsoft Word. For items that accompany the text (letters, figures, copyright forms, etc.), you may upload the following file types: .xls, .ppt, .gif, .pdf, .jpg, .eps, .png, and .tif. However, for the manuscript text, do NOT upload .pdf files, but rather use the Word "Save As" option to save your text as a .doc file. Reviewers will see a PDF containing all files you uploaded except for those files you have marked as "Not for Review." Other file types such as LaTeX files and QuickTime movies can be uploaded. Videos are best uploaded in mp4 format.

MANUSCRIPT FORMATTING

Spacing. The text should be in 11 or 12 point type, fully double-spaced, leaving a margin of 1 inch on all sides. Continuous line numbers (NOT restarting with each page) should be included throughout the manuscript and pages should be numbered consecutively.

Title page. This should include, in the following sequence, the title, a list of all authors, and author institutions, identified by superscripts in Arabic numerals. The corresponding author should be denoted by an asterisk, with address, e-mail, and phone number in a footnote. Also include a list of up to 5 key words and the word counts for the abstract and for the text (not including the abstract, figures, or references). The title page should also list the number of figures, tables, and other pertinent information such as supplementary materials.

Title. The manuscript title should be as succinct as possible. Titles should generally not include abbreviations. A running head, for use as a header, should also be provided; the running head should be not longer than 60 characters (including spaces).

Style. American spelling should be used. Indent the first sentence of each paragraph. Use only one space between sentences. For presentation of a series of terms, a serial comma (e.g. “red, white, and blue”) should be used. For italics, italicize the words and phrases in your text, but do not underline. Italicize genus and species. For words that were originally foreign, but are now standard English (e.g. i.e., e.g., in vitro, in vivo), italics are not necessary. For complex sentences, parentheses should enclose brackets. Punctuation should follow the parentheses. Superscripts, including reference numbers, should directly follow punctuation marks. Numbers in text should be in Arabic format, except for one. Insert a space between a number and a unit of measure and both before and after the < symbol, > symbol, and = symbol; no space is needed between a number and the % sign.

Abbreviations. Abbreviations are commonly overused, compromising the clarity of manuscripts. Authors are advised to keep abbreviations to a minimum, using them when they are clearer than long terms (e.g. PCR, DNA), but avoiding them when possible when they are non-standard and idiosyncratic. Abbreviations should conform to the AMA Style Manual (<http://amamanualofstyle.com>). Terms should be spelled out with first usage in both the abstract and text, with the abbreviation following in parentheses. After this first usage, the abbreviation must be used consistently. Plurals of abbreviations do not require apostrophes.

Drug names. Proprietary names of drugs may not appear in the title but may be used in conjunction with the generic name when the drug is first mentioned in the abstract, and again when first mentioned in the text. Thereafter, use only the generic name.

Names of organisms. Genus and species should be italicized. After the first usage the genus should be abbreviated with a single letter (e.g. *E. coli*). For different species within a genus, the genus should be spelled out with the first usage of each. Adjectives referring to organisms (e.g. plasmodial, falciparum malaria) are not italicized. Viral nomenclature should be based on the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; see: <http://amamanualofstyle.com>). A complete listing of ICTV recognized viral species can be found at: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4911.aspx.

Figures. Figures should be numbered in Arabic numerals and cited in the text. It should be noted that a fee is required for color illustrations in print, but authors can choose black & white in print, but color online at no charge. All figures should contain a brief legend.

Tables. Tables should be serially numbered in Arabic numerals and cited in the text. Each table should be placed on a separate page at the appropriate point in the text or at the end of the manuscript.

References. References must use standard AJTMH formatting; please refer to prior issues of the Journal and the information below to assure correct formatting. References should be cited by consecutive numbers in the text. The numbers should appear in superscripts that appear after closing punctuation. All authors should be listed. Abbreviate journal names as in PubMed, with journal name and volume number in italics. References should be from peer-reviewed publications. Unpublished sources, including abstracts, conference proceedings, dissertations, and manuscripts not yet accepted for publication, should be cited in parentheses in the text as unpublished data or a personal communication (e.g. Kazura, J., personal communication).

Examples of references:

Durbin AP, Whitehead SS, 2013. The dengue human challenge model: has the time come to accept this challenge? *J Infect Dis* 207: 697–699.

Muirhead-Thomson RC, 1953. *Mosquito Behavior in Relation to Malaria Transmission and Control in the Tropics*. London, UK: Edward Arnold and Company.

White GW, 2007. Terminology of insect repellents. Debboun M, Frances SP, Strickman D, eds. *Insect Repellents*. Boca Rotan, FL: CRC Press, 31–46.

GAVI, 2013. Cholera Vaccine Investment Strategy. Available at: <http://www.gavialliance.org/about/strategy/vaccine-investment-strategy/>. Accessed March 11, 2014.

REVIEW PROCESS. After submission, manuscripts are first reviewed by editorial staff. Manuscripts with incorrect formatting or unacceptable language or style will be returned to authors for correction before transmission to the Editor-in-Chief. A common reason for return at this point is unacceptable quality of English, and so authors who are not fluent in English are encouraged to seek help with writing prior to submission. Acceptable manuscripts will be examined by the Editor-in-Chief and either accepted without review, rejected without review, or assigned to a Section Editor. Section Editors elicit reviews from qualified experts. Reviews are considered by Section Editors and the Editor-in-Chief, a decision is made, and authors are notified of review decisions as promptly as possible.

REQUESTED AND EXCLUDED REVIEWERS. Authors must list at least 4 potential reviewers, including name and contact information. The careful selection of relevant experts as reviewers will facilitate and speed up the review process. Please do not list reviewers from

within an author's institution, and, especially for international authors, avoid only local reviewers. Authors may exclude up to 4 individuals as reviewers, although such exclusions should be uncommon.

REVISION OF MANUSCRIPTS. Articles typically require revision before final acceptance. Authors are asked to respond by letter to all concerns raised by editors and reviewers. For each concern the authors should explain exactly how they have modified their manuscript based on the concern, or if they feel that no change is needed, they must justify this decision. Changes to the manuscript must be clearly described, with identification of the site of the change. With resubmission, authors should provide both a marked up version of the earlier submission, with all changes indicated (using Track Changes or highlighting), and a final version. In response to revised manuscripts, editors may seek additional reviews and/or request a second revision, or they may reach a conclusion as to acceptability for publication. Final decisions are confirmed by the Editor-in-Chief.

SHARING OF INFORMATION. Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited, and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the Materials and Methods section. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication date of the paper. New information on arboviruses should be deposited into the registry described at: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>.

ETHICAL GUIDELINES. For all human research, the Material and Methods section must declare that informed consent was obtained from adult participants and from parents or legal guardians of minors and it must include the names of appropriate institutional review boards that approved the project. Clinical trials must have been registered with clinicaltrials.gov or an equivalent body, and the trial number should be provided. For studies involving experimental animals, the Materials and Methods section must declare that the experiments complied with guidelines for the humane use of laboratory animals from the National Institutes of Health or an equivalent organization, and it must include the names of appropriate institutional review boards that approved the project. The journal recommends adhering to the guidelines stated in the Belmont Report <http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/belmont.html> or those set forth by the Council for International Organizations of Medical Sciences http://www.cioms.ch/publications/guidelines/guidelines_nov_2002_blurb.htm

PAGE CHARGES. These are \$125 per page for manuscripts submitted by a Corresponding Author who is a member of the ASTMH and \$150 per page for non-members. Charges for printed color figures are \$1,395 per color plate (one page including one or more color figures). There is no charge for figures that are in color only online. Supplemental data such

as additional tables and figures can be included in the online version of a paper and referenced in the print version. Page charges are due upon receipt of galley proofs. There are no page charges for Letters to the Editor, book reviews, Images in Clinical Tropical Medicine, or manuscripts that are recruited by the editors.

PAGE CHARGE WAIVERS. Manuscripts with only authors from developing countries and with no sources of support for page charges may qualify for a partial or full waiver of charges. Please appreciate that funds for waivers are limited. We do not grant waivers until a paper is accepted.

AJTMH POLICY ON OPEN ACCESS. Manuscripts may be made freely available online immediately upon publication for a flat fee of \$2,500, paid instead of the usual page charges. This fee does not include additional charges for print color figures. For articles for which the open access fee is not paid, authors must honor a 12-month embargo on current content and not deposit their paper in a public repository without permission from the AJTMH (cbs15{at}case.edu). Authors may elect the open access option on the page charge form when they receive their galley proofs, or they may notify the editorial office (cbs15{at}case.edu) of their decision. Published papers will be deposited in PubMedCentral (PMC) by the journal office. Open access articles will be made freely available on PMC at the time of publication. All other articles will be deposited in PMC but will not be available until the 12-month embargo period has expired. Wellcome Trust/Research Council UK authors can self-archive their manuscripts and make these available from PMC and Europe PMC 6 months after the publication date