

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

**CINÉTICA DA ELIMINAÇÃO DE CISTOS E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL SISTÊMICA E SECRETORA INTESTINAL EM GERBILS
(*Meriones unguiculatus*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
*Giardia duodenalis***

Rúbia Mara Rodrigues Amorim

Uberlândia - MG

Julho - 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

**CINÉTICA DA ELIMINAÇÃO DE CISTOS E RESPOSTA IMUNE
HUMORAL SISTÊMICA E SECRETORA INTESTINAL EM GERBILS
(*Meriones unguiculatus*) INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM
*Giardia duodenalis***

**Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.**

Rúbia Mara Rodrigues Amorim

(Aluna)

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury

(Orientadora)

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

(Coorientador)

Uberlândia - MG

Julho - 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A524c Amorim, Rúbia Mara Rodrigues, 1981-
Cinética da eliminação de cistos e resposta imune humoral sistêmica e secretora intestinal em gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente com *Giardia duodenalis* / Rúbia Mara Rodrigues Amorim. - 2008.

92 f. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Cury.

Co-orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1 - Giardíase - Teses. 2. Resposta imune - Teses. I. Cury, Márcia Cristina. II. Taketomi, Ernesto Akio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.993.19

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

Rúbia Mara Rodrigues Amorim

**Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.**

Área de Concentração: Parasitologia

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury

Uberlândia - MG

Julho - 2008

*Essa dissertação é dedicada à **Márcia Cristina Cury**, minha querida orientadora, pelo estímulo, confiança, amizade, paciência, disponibilidade, resignação.....*

Sou infinitamente grata, pois sem o seu auxílio acredito que nada seria possível.

A Deus e a tudo o que ele representa

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me ensinaram os valores reais de perseverança, dedicação e ética.

À minha irmã pela paciência e companheirismo.

Ao João Ricardo, pelo amor, compreensão e incentivo.

*Não se deixe intimidar pela
enormidade do sofrimento do mundo.
Aja corretamente agora. Preze a
compaixão agora. Caminhe com
humildade agora. Você não é obrigado
a consumir o trabalho, mas tampouco
é livre para abandoná-lo.*

Talmud

Agradecimentos

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela competência, pela qualidade do curso e por todo conhecimento propiciado.

Aos amigos Michelle, Cynthia, Dâmaso e Taísa, que assim sempre considerarei, pelo apoio incondicional e ilimitado.

A todos do Laboratório de Parasitologia que se mostraram agradáveis e companheiros.

Ao professor Dr. Ernesto Akio Taketomi e alunos do Laboratório de Alergia por me receber e serem sempre muito solícitos.

À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva pela atenção e auxílio.

À professora Maria José Santos Mundim pela ajuda sempre que solicitada.

Aos técnicos Elaine Silva Marques Faria (Laboratório de Parasitologia - UFU) e João Viana da Costa (Laboratório de Amebíase - UFMG) pelo apoio e disposição.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução desta dissertação.

Muito obrigada!!!

LISTA DE ABREVIACÕES

ABTS	2,2' azino-bis (ácido sulfônico 3 etilbenzotiazolina)
BSA	Soro albumina bovina
CBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
d.a.i.	dias após inoculação
d.a.r.	dias após reinfecção
d.a.im.	dias após imunossupressão
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IgG ₁	Imunoglobulina G ₁
IgG _{2a}	Imunoglobulina G _{2a}
mL	Mililitros
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS - T	Solução salina tamponada com fosfatos acrescida com Tween 20
PMSF	Fluoreto de Fenilmetanosulfonila
Th ₁	Linfócito T helper 1
Th ₂	Linfócito T helper 2
TMB	3,3',5,5'- TetraMetilBenzidina
x g	Vezes a gravidade
μL	Microlitros
μg/mL	Micrograma por mililitro
μm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Período pré-patente e cinética da eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* durante a infecção primária em gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos (ATCC: 30888). Cada ponto representa a média diária de cistos eliminados pelos 8 animais de cada grupo. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....44

Figura 2. Média do número total de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados, por cada grupo inoculado, durante o período patente na infecção primária. Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....45

Figura 3. Cinética de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* após a imunossupressão de gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos na infecção primária. Cada ponto representa a média diária de cistos eliminados pelos 2 animais de cada grupo. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....46

Figura 4. Média do número total de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados por cada grupo inoculado anteriormente e imunossuprimidos com Acetato de MetilPrednisolona (MPA). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....48

Figura 5. Cinética de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* em gerbils após a reinfecção com a mesma dose de trofozoítos inoculada na infecção primária e imunossupressão com MPA. Cada ponto representa a média diária de cistos eliminados pelos 2 animais de cada grupo. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....49

Figura 6. Média do número de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados após a reinfecção e imunossupressão com Acetato de MetilPrednisolona (MPA) em gerbils (*Meriones unguiculatus*) em relação ao inóculo de trofozoítos. (A) 10^1 trofozoítos. (B) 10^2 trofozoítos.

(C) 10^3 trofozoítos. (D) 10^4 trofozoítos. (E) 10^5 trofozoítos. Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....50

Figura 7. Cinética da resposta imune humoral secretora intestinal (IgA fecal) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —▲— A (10^1 trofozoítos) —▼— B (10^2 trofozoítos) —✕— C (10^3 trofozoítos) —◇— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$ 52

Figura 8. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgA sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —▲— A (10^1 trofozoítos) —▼— B (10^2 trofozoítos) —✕— C (10^3 trofozoítos) —◇— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (*) $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$ 54

Figura 9. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgG₁ sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —▲— A (10^1 trofozoítos) —▼— B (10^2 trofozoítos) —✕— C (10^3 trofozoítos) —◇— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$ 56

Figura 10. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgG_{2a} sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a

média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —▲— A (10^1 trofozoítos) —▼— B (10^2 trofozoítos) —✕— C (10^3 trofozoítos) —○— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS).....58

Figura 11. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgM sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —▲— A (10^1 trofozoítos) —▼— B (10^2 trofozoítos) —✕— C (10^3 trofozoítos) —○— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$ 60

Figura 12. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgE sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —▲— A (10^1 trofozoítos) —▼— B (10^2 trofozoítos) —✕— C (10^3 trofozoítos) —○— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$ 62

Figura 13. Massa corpórea dos animais durante (a) infecção primária em gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos (ATCC: 30888); (b) reinfecção; (c) imunossupressão; (d) reinfecção/imunossupressão. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diluições das amostras de soro, anticorpos secundários e estreptavidina-peroxidase e seus respectivos diluentes utilizados para a realização do ensaio imunoenzimático.....38

Tabela 2: Diluições das amostras de extratos fecais, anticorpo secundário e estreptavidina-peroxidase e seus respectivos diluentes utilizados para a realização do ensaio imunoenzimático.....39

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	30
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais	33
3.2 Parasitas	33
3.3 Infecção experimental	34
3.4. Cinética de eliminação de cistos	34
3.5. Determinação do número de cistos eliminados	35
3.6 Preparo do antígeno solúvel de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	35
3.7 Obtenção do soro	36
3.8 Obtenção de extratos fecais	36
3.9 Detecção dos Anticorpos Séricos IgA, IgE, IgG ₁ , IgG _{2a} e IgM específicos a <i>G. duodenalis</i>	36
3.10 Detecção de IgA secretora em extrato fecal	38
3.11 Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/Imunossupressão	39
3.12 Variação da massa corpórea dos animais na Infecção Primária, Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/Imunossupressão	40
3.12 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Determinação do Período Pré-Patente e Cinética de Eliminação: Infecção Primária, Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/ Imunossupressão	42
4.2 Análise sorológica: Infecção Primária, Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/Imunossupressão	51
4.2.1 IgA fecal	51
4.2.2. IgA sérica	53
4.2.3. IgG ₁ sérica	55
4.2.4. IgG _{2a} sérica	57
4.2.5. IgM sérica	59
4.2.6. IgE sérica	61
4.3 Determinação da Massa Corpórea	63

5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

RESUMO

Giardia duodenalis é um dos principais agentes causadores de diarreia em todo o mundo, sendo transmitido por via oro-fecal. A giardíase é, usualmente, auto-limitante em indivíduos imunocompetentes, indicando a presença de mecanismos efetivos de defesa do hospedeiro. O objetivo desse estudo foi determinar o período pré-patente e avaliar a cinética de eliminação de cistos e a resposta imune humoral sistêmica (IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgM, IgE) e secretora intestinal (IgA) em gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados, experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, na infecção primária, reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão. Foram utilizados 48 animais, com idade entre 6 e 8 semanas, distribuídos em 5 grupos inoculados com diferentes doses de trofozoítos de *G. duodenalis* (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) e um grupo controle. Exames coproparasitológicos foram realizados, diariamente, utilizando método de flutuação em sulfato de zinco a 33%, para determinar o período pré-patente e a cinética de eliminação de cistos. Semanalmente, coletas sanguíneas por punção retro-orbital foram realizadas e amostras de fezes foram processadas para obtenção de extratos fecais. No 45º dia após inoculação, os animais de cada grupo foram redistribuídos em 4 subgrupos e submetidos à reinfecção, imunossupressão ou reinfecção/imunossupressão. Verificou-se que todos os gerbils inoculados com diferentes doses de trofozoítos mostraram-se susceptíveis à infecção primária, com período pré-patente entre 9 e 13 dias. Os animais reinfetados não voltaram a eliminar cistos e os imunossuprimidos ou reinfetados/imunossuprimidos apresentaram recrudescência da infecção. A produção de anticorpos foi induzida pelo parasito, embora os sistêmicos apenas reflitam a estimulação da resposta imune por *G. duodenalis*, já que não atuam na eliminação do parasito. Na reinfecção foi observada rápida produção de anticorpos séricos e secretores e os animais imunossuprimidos apresentaram baixos níveis de anticorpos responsáveis pelo controle da infecção. A IgA fecal mostrou aumento nos títulos no período em que se verificou ausência de cistos nas fezes, podendo estar correlacionada com o controle da giardíase neste modelo experimental.

Palavras-chaves: *Giardia duodenalis*, gerbils, resposta imune humoral

ABSTRACT

Giardia duodenalis is one of the main causative agents of diarrhea worldwide, being transmitted by oral-fecal route. Giardiasis is usually self-limiting in immunocompetent individuals, indicating the presence of effective host defense mechanisms. The objective of that study was to determine the prepatent period and to evaluate the kinetics of elimination of cysts and the immune response humoral systemic (IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgM, IgE) and intestinal secretory (IgA) in gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculated, experimentally, with different doses of trophozoites of *Giardia duodenalis*, in the primary infection, reinfection, immunosuppression and reinfection/immunosuppression. We used 48 animals, 6-8 weeks old, distributed in 5 groups inoculated with different doses of trophozoites of *G. duodenalis* (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5) and a group control. Coproparasitology exams were carried out, daily, using the method of fluctuation in zinc sulfate 33%, to determine the prepatent period and the kinetics of elimination of cysts. Weekly, blood collections for retro-orbital puncture were performed and samples of feces were processed for obtaining of faecal extracts. In the 45th day after inoculation, the animals of each group were redistributed in 4 subgroups and submitted to the reinfection, immunosuppression or reinfection/immunosuppression. It was verified that all the gerbils inoculated with different trophozoites doses were susceptible to the primary infection, with prepatent period between 9 and 13 days. The reinfected animals didn't eliminate cysts and the immunosuppressed or reinfected/immunosuppressed again they presented recrudescence of the infection. The production of antibodies was induced by the parasite, although the systemics antibodies just reflect the stimulation of the immune response for *G. duodenalis*, since they don't act in the elimination of the parasite. In the reinfection it was observed fast production of both serum and secretory antibodies and the immunosuppressed animals they presented smaller levels of responsible antibodies for the control of the infection. Fecal IgA showed increase in the titles in the period in that absence of cysts was verified in the feces, could be correlated with the control of the giardiasis in this experimental model.

Keys-words: *Giardia duodenalis*, gerbils, humoral immune response

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Dentre os protozoários que freqüentemente acometem os animais e o homem, *Giardia* spp. tem despertado interesse, possivelmente, pelo potencial zoonótico, além de causar, em crianças e em animais jovens, diarreia intermitente com comprometimento da digestão e absorção de alimentos, acarretando desidratação, perda de peso e morte (MUNDIM et al., 2003).

O protozoário flagelado binucleado *Giardia* spp. pertence ao filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Foi primeiramente observado em 1681 por Antonie van Leeuwenhoek, entretanto sua descrição, detalhada, ocorreu somente em 1859 por Lambl.

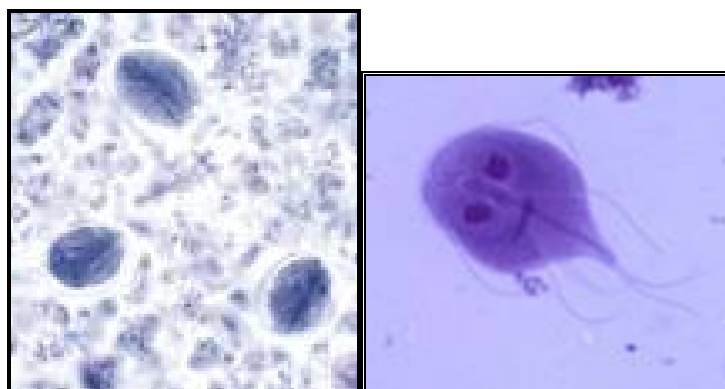
O conceito de uma rígida especificidade de hospedeiro, proposto por Hegner (1922) dominou a taxonomia e a epidemiologia da giardíase por vários anos, tendo sido descritas mais de 50 espécies (THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990; KULDA; NOHYNKOVA, 1996; THOMPSON, 2002). A classificação baseava-se na espécie animal do hospedeiro onde era encontrada (LANE; LLOYD, 2002), sendo *Giardia bovis* em bovinos, *Giardia canis* em cães, *Giardia cati* em gatos, *Giardia lamblia* no homem (KENNEDY, 1989).

Em 1952, Filice propôs a nomenclatura baseada em critérios morfológicos do protozoário, onde o gênero compreenderia três grupos distintos. O grupo *Agilis* com a espécie *Giardia agilis* acometendo anfíbios; o grupo *Muris*, cuja espécie *Giardia muris* acometendo roedores e o grupo *Duodenalis*, com a espécie *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*) acometendo grande quantidade de mamíferos, inclusive o homem. Posteriormente, com os avanços nas técnicas de análises de DNA e RNA ribossomal, aliadas às técnicas de cultivo axênico e microscopia eletrônica, permitiram a identificação de outras três novas espécies: *Giardia psittaci* (ERLANDSEN; BEMRICK; PAWLEY, 1987) e *Giardia ardeae* (ERLANDSEN et al., 1990) encontradas em aves e *Giardia microti*, parasito de roedores do campo e rato-almiscarado (MONIS et al., 2003).

Estudos comparativos entre vários isolados de *Giardia* spp., demonstraram considerável grau de diversidade genética (THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990; MAYRHOFER et al., 1995; HOPKINS et al., 1997; THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000). Acredita-se que essa diversidade, possa influenciar na epidemiologia, susceptibilidade do hospedeiro, virulência, no crescimento e desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* do parasito, na sensibilidade a drogas e na antigenicidade (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993).

Com o auxílio da biologia molecular foi possível demonstrar que *G. duodenalis* é uma complexa espécie que compreende no mínimo sete “Assemblages” (A-G) (ANDREWS et al., 1989; MAYRHOFER et al., 1995; MELONI; LYMBERY; THOMPSON, 1995; MONIS et al., 2003). A Assemblage A (Polish) apresenta pouca diversidade genotípica, acometendo várias espécies de mamíferos. Nesta, o subgrupo A-I compreende isolados humanos e de animais pouco diversos geneticamente e o subgrupo A-II engloba apenas isolados de origem humana. A sublinhagem B (Belgian) apresenta maior grau de diversidade genotípica acometendo o homem e também outras espécies de mamíferos, porém em escala menor. As sublinhagens C e D acometem cães; a E, rebanhos de animais de casco; a F, gatos e a sublinhagem G acomete ratos (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; MONIS et al., 2003).

Morfológicamente, o parasito se apresenta por duas formas evolutivas denominadas de cisto e trofozoíto. O cisto é a forma infectante, medindo de 8,0 a 12,0 μm de comprimento por 7,0 a 10,0 μm de largura, circundado por uma parede de 0,3 μm de espessura e possui dois a quatro núcleos, corpos basais e elementos estruturais do disco ventral (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993). É encontrado, freqüentemente, em fezes formadas, apresentando alta resistência no ambiente e permanecendo viável por vários meses, principalmente, em locais úmidos (LANE; LLOYD, 2002). O trofozoíto representa a forma vegetativa do parasito. É bilateralmente simétrico e dorsoventralmente achatado, medindo em torno de 12,0 a 15,0 μm de comprimento e 5,0 a 9,0 μm de largura. Apresenta dois núcleos de tamanhos iguais na parte anterior, dois axonemas, um disco suatorial ou adesivo ventral, dois corpos médios e quatro pares de flagelos (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993).

**Cisto****Trofozoíto**

Apresenta ciclo biológico direto, iniciado pela ingestão de cistos presentes em água ou alimentos contaminados. Mediante exposição ao suco gástrico, pH ácido e enzimas pancreáticas, ocorre ruptura do cisto na região anterior do intestino delgado (duodeno), liberando um excizoíto que rapidamente se divide em 4 trofozoítos (BERNANDER; PALM; SVÄRD, 2001). Os trofozoítos liberados iniciam um processo de multiplicação por fissão binária nas criptas do duodeno e nas regiões superiores do jejuno. Eles colonizam diferentes porções do intestino, entretanto, a maioria adere às microvilosidades das células epiteliais da porção inicial do intestino. Não ocorrem estágios intracelulares no ciclo de vida da *Giardia* spp. e, normalmente, não há invasão de tecidos epiteliais (ZAJAC, 1992). A ação dos sais biliares e dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro, responsáveis pelo destacamento dos trofozoítos das mucosas, induz o encistamento dos mesmos possibilitando, a liberação dos cistos juntamente com as fezes no meio ambiente (ORTEGA; ADAM, 1997).

O processo de encistamento inicia-se pela ativação de genes específicos por estímulos externos, seguida pela biogênese de organelas secretoras que realizarão a síntese, empacotamento, transporte e liberação dos constituintes da parede cística, que possibilitarão a sobrevivência dos cistos por até 8 semanas no meio ambiente (LUJAN; MOWATT; NASH, 1998; ZAJAC; JOHNSON; KING, 2002) e três meses em água a 4°C (MEYER, 1990). Além disso, condições específicas como pH próximo a 7,8, sais biliares e ácidos graxos são essenciais para a promoção do encistamento (ADAM, 2001). Os cistos são detectados nas fezes uma a duas semanas após a infecção. Os trofozoítos, também, podem ser transmitidos pelas fezes, mas raramente sobrevivem por um período significativo fora do hospedeiro (ZAJAC; JOHNSON; KING, 2002).

O protozoário *Giardia duodenalis* é considerado o mais freqüente dos parasitos intestinais do homem, causando $2,8 \times 10^6$ novas infecções anualmente (ALI; HILL, 2003). Apresenta ampla distribuição mundial, sendo encontrado tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, com taxas de prevalência que podem chegar a 7 e 60%, respectivamente (GOLDIN et al., 1990; THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990). Este parasito acomete cerca de 30% da população brasileira, estando a prevalência altamente associada à área geográfica, à população estudada e à metodologia utilizada. A faixa etária mais acometida é a de crianças entre oito meses a dez anos. Vários trabalhos epidemiológicos foram realizados, mostrando prevalências variando entre 13,8 e 63,3% entre as crianças (COSTA et al., 1988; TORRES et al., 1991; CURY et al., 1994; GUIMARÃES; SOGAYAR, 1995).

A transmissão da giardíase ocorre por contaminação fecal-oral, mais comumente pela ingestão de água ou alimentos contendo cistos do parasito (UNGAR et al., 1984). O consumo de água não tratada ou filtrada, representa risco significativo para giardíase, estando os surtos ligados ao consumo de água não filtrada ou proveniente de sistemas subterrâneos contaminados por fontes superficiais (HOQUE et al., 2002; JAKUBOWSKI; GRAUN, 2002; THOMPSON, 2004). Na forma cística, o parasito se mostra altamente resistente à cloração e ozonização, sendo a filtração o único processo que garante a remoção dos cistos (LANE; LLOYD, 2002). Dessa forma, a água se torna importante veículo de transmissão de *G. duodenalis*, constituindo sério problema em saúde pública (THOMPSON, 2000).

A transmissão direta, pessoa a pessoa, constitui outra via eficiente de infecção, principalmente, em instituições coletivas como creches, orfanatos, entre pessoas da mesma família, quando as condições de higiene são deficientes e entre praticantes de sexo anal (ORTEGA; ADAM, 1997). Ela pode ser efetiva com 1 a 10 cistos, mesmo existindo divergências expressivas entre os isolados de *Giardia duodenalis*, em relação à virulência e diversidade antigênica. No entanto, estudos com animais experimentais têm demonstrado que inóculos com quantidades inferiores a 10 cistos apresentam maior período pré-patente (HEALTH CANADÁ, 2004).

Os trofozoítos, usualmente, não estão envolvidos na transmissão de *Giardia* spp., embora a ocorrência da infecção por essa forma seja possível. Estudos demonstraram que a forma trofozoítica mostra-se sempre infectante, enquanto cistos de diferentes pessoas ou animais, ou até mesmo aqueles eliminados em diferentes dias, poderiam apresentar infectividade variada (HEWLETT, et al., 1982).

Vários modelos experimentais têm sido propostos, na busca de novos dados sobre o desenvolvimento e patogenia da infecção por *G. duodenalis*, tais como castores, ratos filhotes e adultos (SEHGAL et al., 1976; VINAYAK; SHARMA; NAIK, 1979; CRAFT, 1982; HILL et al., 1983), coelhos (SCHLEINITZ et al., 1983), cães (HEWLETT et al., 1982), gatos (KIRKPATRICK; GREEN, 1985) e gerbils (*Meriones unguiculatus*) (BELOSEVIC et al., 1983). Entretanto, bons resultados foram somente obtidos com gerbils e filhotes de hamster, embora Faubert et al. (1983) considerem o gerbil como o animal que mais se adequa como modelo experimental para *G. duodenalis*, devido à alta susceptibilidade a infecções por inoculação oral de cistos e trofozoítos com grande quantidade de eliminação de cistos nas fezes, alterações patofisiológicas similares às aquelas observadas em humanos, tamanho e facilidade de manipulação.

Experimentos com modelos animais infectados com *Giardia* spp. têm sido questionados em relação à possibilidade destes não estarem, efetivamente, livres de parasito, à dose de cistos inoculados em quantidades excessivas, que não representariam as infecções naturais e à utilização de isolados de culturas axênicas que poderiam apresentar virulência reduzida (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; MONIS; THOMPSON, 2003). Entretanto, deve ser enfatizado que a ausência de resultados satisfatórios em alguns experimentos não deve ser relacionada apenas aos problemas acima citados, mas também à diversidade genética, diferenças na viabilidade dos cistos, variação na resposta imune do hospedeiro experimental e à sensibilidade das técnicas para detecção de cistos (FAUBERT, 2000; MONIS; THOMPSON, 2003; THOMPSON; MONIS, 2004). Apesar dessas controvérsias, estes estudos permanecem como fontes de informação nas perspectivas epidemiológicas e zoonóticas da transmissão de *G. duodenalis* e na procura do entendimento dos mecanismos patogênicos e imunológicos.

A giardíase é caracterizada por ampla variação de sintomas (ADAM, 1991). Em muitos indivíduos, a infecção permanece assintomática ao passo que em outros exibem sintomas graves. Os mais proeminentes sinais clínicos da giardíase são cólicas abdominais, náuseas seguidas por diarreia, possivelmente como consequência da má-absorção e perda de peso (MÜLLER; von ALLMEN, 2005). A má-absorção de lípides, proteínas, carboidratos, vitamina A e B12 (HALL, 1994), a perda de peso, aliadas à frequência e duração da infecção e a oportunidade de reinfecção (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993), têm sido, freqüentemente, identificadas como os principais fatores favorecedores do atraso de crescimento entre crianças (GOLDIN et al., 1990).

Estudos indicam que as infecções por *G. duodenalis* são processos patofisiológicos complexos. Um destes processos é a alteração da permeabilidade epitelial, resultado de efeitos citopáticos diretos induzidos pelos produtos do parasito (BURET et al., 2002). O aumento da permeabilidade leva a resposta inflamatória, alterando a digestão, absorção de nutrientes (dissacarídeos, gorduras e vitaminas), destruição de vilosidades e deficiência de dissacaridases, podendo resultar no aumento de antígenos lumenais, responsáveis por desordens alérgicas (ZAJAC, 1992; SCOTT et al., 2002).

Fatores ligados ao hospedeiro como condição imunológica, idade, estado nutricional e ao parasito, como virulência, patogenicidade, número de cistos ingeridos e a presença de infecções concomitantes determinam, em conjunto, o curso clínico da infecção, ficando evidente a ocorrência da giardíase em imunodeficientes, desnutridos ou em indivíduos muito jovens (BOREHAM, 1991).

Em relação à resposta imune do hospedeiro à giardíase, estudos têm demonstrado que o controle da infecção é obtido por vários fatores imunológicos, incluindo células T_H $CD4^+$ e citocinas derivadas (CARLSON; HEYWORTH; OWEN, 1987; HEYWORTH; CARLSON; ERMAL, 1987; VENKATESAN et al., 1996; DJAMIATUN; FAUBERT, 1998; SINGER; NASH, 2000); anticorpos IgA local (HEYWORTH, 1986; SNIDER; SKEA; UNDERDOWN, 1988; SKEA; UNDERDOWN, 1991; LANGFORD et al., 2002); óxido nítrico (ECKMANN et al., 2000); mastócitos intestinais e seus produtos (ERLICH et al., 1983; HARDIN et al., 1997; VENKATESAN et al., 1997; LI et al., 2004).

A importância da população de células T_H no controle da giardíase foi primeiramente demonstrada por Stevens; Frank; Mahmoud (1978). Os autores observaram que camundongos depletados desenvolveram infecções prolongadas e quando ocorria a transferência adotiva de linfócitos T, a infecção era controlada. Heyworth; Carlson; Ermal (1987) demonstraram que a depleção de células T_H , mas não de células $CD8^+$, levaram à prolongação da infecção e exacerbação da eliminação de cistos, sugerindo que as células T $CD8^+$ não possuem papel efetivo na giardíase.

A atuação das células B é igualmente importante para a eliminação efetiva da *Giardia* spp. do lúmen intestinal (SNIDER; UNDERDOWN, 1986; SNIDER; SKEA; UNDERDOWN, 1988; SKEA; UNDERDOWN, 1991; LANGFORD et al., 2002). Camundongos geneticamente deficientes em células B funcionais (atímicos, depletados, nocauteados) ou tratados com anticorpo anti-IgM depletante, tendem a apresentar infecções prolongadas, diferentemente de camundongos imunocompetentes (SKEA; UNDERDOWN, 1991; LANGFORD et al., 2002). Além disso, incidências elevadas de giardíase são observadas em indivíduos hipogamaglobulinêmicos, sugerindo a importância da imunidade humoral na eliminação do parasito (HUGHES et al., 1971; AMENT; RUBIN, 1972; HERMANS; DIAZ-BUXO; STOBO, 1976).

Ridley e Ridley (1976) foram os primeiros a relatar a presença de anticorpos anti-*Giardia duodenalis* no soro de humanos infectados. Embora esses indivíduos produzam anticorpos circulantes específicos contra o parasito, o papel desses anticorpos na imunidade protetora e os mecanismos que levam a sua indução não são completamente compreendidos (HEYWORTH, 1992). Entretanto, sugere-se que possam atuar na resistência à infecção pela fixação de complemento e/ou pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (NASH; AGGARWAL, 1986; BELOSEVIC; FAUBERT; DHARAMPAUL, 1994; DANIELS; BELOSEVIC, 1994). Smith; Keister; Elson (1983) demonstraram que IgG sérica

específica ao parasito poderia participar na citotoxicidade celular dependente de anticorpo com leucócitos polimorfonucleares periféricos humanos *in vitro*.

Vários estudos demonstram a presença de anticorpos IgA, IgG e IgM específicos à *Giardia* spp. nas secreções intestinais de camundongos infectados (HEYWORTH, 1986; SNIDER; UNDERDOWN, 1986; SKEA; UNDERDOWN, 1991; HEYWORTH, 1992; ABDUL-WAHID; FAUBERT, 2008). Esses anticorpos atuam diretamente no controle da giardíase, pois se ligam aos antígenos de superfície presentes no disco adesivo, interferindo na aderência dos trofozoítos na mucosa intestinal além de promoverem a imobilização e aglutinação dos trofozoítos (HEYWORTH, 1986; LANGFORD et al., 2002). Entretanto, a produção de anticorpos IgA tem mostrado ser o isotipo mais abundante em mucosas e o mais importante requerido para o controle e eliminação do parasito no intestino delgado (SNIDER; UNDERDOWN, 1986; SNIDER; SKEA; UNDERDOWN, 1988; SKEA; UNDERDOWN, 1991; LANGFORD et al., 2002) .

Jiménez et al. (2004) observaram que a infecção por *G. duodenalis* induz resposta imune para outros alérgenos, explicando, em parte, o aumento da tendência a urticárias e de alergias a alimentos em pacientes positivos para este parasito. O mecanismo pelo qual, o parasito promove este fenômeno, não está elucidado, mas acredita-se que antígenos de excreção e secreção estejam envolvidos, auxiliando na migração e no acúmulo de eosinófilos nas vilosidades.

Semelhante a humanos, os gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados com cistos ou trofozoítos de *G. duodenalis*, apresentam resolução espontânea da giardíase, não sendo detectados cistos nas fezes após 40 dias de infecção (AGGARWAL; NASH, 1987; FAUBERT, 2000; OLSON; CERI; MORCK, 2000; ARAÚJO et al., 2008). Porém, a ausência de cistos após esse período não indica, necessariamente, que o parasito foi eliminado do intestino delgado. Possivelmente, isso ocorre pelo pequeno número de trofozoítos ou células encistadas, não sendo detectados pelos métodos de diagnóstico por concentração convencionais. Portanto, o fenômeno autolimitante verificado na giardíase pode não representar um estado de proteção imune no hospedeiro infectado (FAUBERT, 2000).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que exposições anteriores à *Giardia* spp. interfiram na susceptibilidade à reinfecção (MOORE et al., 1969; WRIGHT et al., 1977). A imunidade adquirida por animais experimentalmente infectados tem sido documentada e parece ser de longa duração. Gerbils infectados com 10^3 trofozoítos de *G. duodenalis* se mostraram protegidos até oito meses após a infecção primária (BELOSEVIC et al., 1983; LEWIS et al., 1987; BELOSEVIC; FAUBERT; MacLEAN, 1989).

Na tentativa de esclarecer o papel dos linfócitos T e B na defesa do hospedeiro diante a infecções, animais de laboratório são submetidos a tratamentos com drogas capazes de interferir na supressão do sistema imune (GEERTS; KUMAR; BRANDT, 1982; ZIAM et al., 1999, MILLER; SCHAEFER III, 2007). Os glicocorticóides são as drogas mais utilizadas, uma vez que interferem na circulação das células imunes atuando, principalmente, na diminuição do número de linfócitos periféricos, inibem o acúmulo de neutrófilos no local da inflamação, modulam a função das células B e atuam na redução da atividade dos macrófagos e diminuição da transcrição dos fatores de adesão celular (KOUNTZ; CLARK, 1997; ZOOROB; CENDER, 1998). Lewis et al. (1987) demonstraram que gerbils tratados com o imunossupressor acetato de hidrocortisona, 50 ou 70 dias ou até 7 meses após a infecção por *G. duodenalis*, apresentaram recrudescência na infecção, com eliminação de cistos nas fezes. Isso significa que, mesmo o animal não esteja eliminando cistos, o parasito continuou presente no animal. Com a imunossupressão, o parasito se favoreceu com a deficiência do sistema imune do animal e começou a se multiplicar novamente. Dentre os imunossupressores, o Acetato de MetilPrednisolona – MPA, é o glicocorticóide mais utilizado atualmente por apresentar melhor absorção e indução de menos efeitos colaterais. Foi demonstrado por Miller; Schaefer, 2006, que uma única dose de MPA a 600 mg/kg em camundongos foi capaz de diminuir os linfócitos T e B em mais de 90%, após 24 h até 14 dias após a aplicação. Os linfócitos T e B retornaram aos níveis pré-supressão somente após 41 dias.

Dentre os métodos parasitológicos de diagnóstico empregados para detecção deste parasito, o método de flutuação em sulfato de zinco a 33% (FAUST et al., 1938) se mostra como o mais eficiente, prático e rápido.

Os ensaios imunoenzimáticos são considerados poderosos instrumentos para a detecção de anticorpos, pois apresentam sensibilidade de 92% e especificidade de 98% (UNGAR et al., 1984). Vários kits para detecção de antígenos de *Giardia* spp. para o diagnóstico da giardíase estão disponíveis comercialmente (ROCHA et al., 1999; FEDORKO et al., 2000) com sensibilidade variando de 85 a 98% e especificidade entre 90 e 100%. Possuem excelente especificidade e sensibilidade, além da vantagem da agilidade da execução e interpretação da técnica, podendo ser de grande utilidade em levantamentos epidemiológicos (VIDAL; CATAPANI, 2005).

O tratamento de pacientes sintomáticos com giardíase é realizado principalmente com a utilização do Metronidazol, e em casos mais graves, ocorre necessidade de tratamento

múltiplo ou combinado (ORTEGA; ADAM, 1997). Em mulheres grávidas, o tratamento deve ser realizado com Paramonicina, devido aos efeitos teratogênicos apresentados pelos outros medicamentos (HILL, 1993).

Baseado no que foi exposto, observa-se que a variação da resposta imunológica do hospedeiro é de fundamental importância para determinar o curso e a sintomatologia na infecção por este parasito. Contudo, apesar de sua distribuição cosmopolita e importância clínica, pouco se sabe a respeito dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção.

Apesar dos gerbils (*M. unguiculatus*) serem considerados animais de escolha para avaliação do perfil clínico e patológico, trabalhos relacionados à resposta imune nesses animais, quando inoculados com diferentes isolados ou doses de *G. duodenalis*, são escassos.

Dessa forma, a avaliação da resposta imune na giardíase em um modelo tão semelhante ao homem, no que tange a susceptibilidade à infecção, é fundamental para auxiliar o entendimento desse mecanismo.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar o perfil de eliminação de cistos e cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgM, IgE) e secretora intestinal (IgA) em gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, na infecção primária, reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão.

2.2 Específicos

- Determinar o período pré-patente da infecção primária em gerbils inoculados com diferentes doses de trofozoítos de *G. duodenalis*;
- Observar se há recrudescência após a reinfecção em gerbils inoculados com diferentes doses de trofozoítos;
- Observar o comportamento da infecção em gerbils imunossuprimidos;
- Observar o comportamento da infecção em gerbils reinfectados/imunossuprimidos;
- Observar se os animais apresentam o fenômeno de resistência adquirida;
- Comparar a resposta imune humoral sistêmica e secretora intestinal com o perfil de eliminação de cistos na infecção primária, reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados gerbils (*Meriones unguiculatus*), descendentes de genitores livres de patógenos específicos, mantidos no Centro e Bioterismo de Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia sob condições controladas de temperatura (22°C), umidade relativa de 40% e fotoperíodos de 12 horas. Exames coproparasitológicos dos genitores foram realizados pelos métodos de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco a 33%, densidade 1,18 (FAUST et al., 1938) a intervalos de três dias durante 21 dias, para verificar a ausência de parasitos. Todos os animais receberam ração comercial para roedores autoclavada e água mineral *ad libitum*. Os cuidados com higienização de gaiolas, mamadeiras, água e ração foram realizados para garantir que nenhuma outra fonte de infecção acometesse estes animais durante todo o período experimental. Das crias, foram selecionados para o experimento, 48 gerbils de ambos os gêneros, com idade entre 6 e 8 semanas. Antes do início do experimento, amostras fecais de todos os animais foram analisadas, periodicamente, para certificar a ausência de patógenos.

Os grupos de animais foram mantidos e manuseados isoladamente, sob condições de experimentação de acordo com as normas de ética para experimentação animal propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – (COBEA, 2008).

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2 Parasitos

Os trofozoítos do isolado humano Portland-1 (ATCC: 30888) de *Giardia duodenalis*, Assemblage A, foram cedidos pelo Laboratório de Amebíase e Giardíase do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde são mantidos em meio TYI-S-33 (DIAMOND; HARLOW; CUNNICK, 1978) modificado por Keister (1983) e suplementado com soro fetal bovino em posição inclinada em estufa bacteriológica com temperatura entre 35,5 e 37°C. Os repiques foram realizados a cada 72/96 horas, sendo os trofozoítos obtidos em fase exponencial de crescimento, entre 48-72 horas de cultivo. Em seguida, os tubos contendo os trofozoítos foram acondicionados em caixa térmica, mantendo-

se temperatura constante de 37°C e encaminhados para Universidade Federal de Uberlândia. As formas trofozoíticas foram utilizadas para realização do inóculo experimental e preparo do antígeno solúvel em ensaios imunológicos.

3.3 Infecção experimental

Os 48 animais foram distribuídos igualmente em seis grupos (A-F), sendo o grupo F o controle (não infectado). Cada grupo foi subdividido, para que machos e fêmeas fossem mantidos em gaiolas separadas. A inoculação de trofozoítos de *G. duodenalis* foi realizada por via oral, utilizando-se cânula tipo Delvo nº. 15, acoplada a seringa de 1mL. Os animais dos grupos A, B, C, D e E receberam doses crescentes de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 , respectivamente) diluídos em 1mL de solução salina tamponada com fostato 0,01 M (PBS, pH 7,2) e os animais do grupo F, receberam como inóculo, 1mL de PBS.

Para o preparo do inóculo, diferentes concentrações de trofozoítos foram ajustadas em 1mL de solução de acordo com os experimentos de Hewlett et al. (1982). Os tubos de cultura foram imersos em banho de gelo por 20 minutos, para o desprendimento dos trofozoítos da parede do recipiente. Em seguida, 0,1 mL do meio com os parasitos foi adicionado a um frasco com 0,5 mL de PBS, 0,4 mL de corante vital (Eosina) e uma gota de formol para imobilização dos trofozoítos. Desta solução, retirou-se 0,01 mL para contagem em câmara de Neubauer nos seus quadrantes externos e o resultado obtido foi multiplicado por 2.500.

A quantidade de trofozoítos encontrada foi ajustada por diluição seriada em PBS estéril (pH 7,0-7,2) para a obtenção do número desejável para as diferentes doses de inóculo.

3.4 Cinética de eliminação de cistos

Para determinar o período pré-patente e acompanhar a cinética de infecção, exames coproparasitológicos individuais foram realizados diariamente, do primeiro ao 42º dia após a inoculação (d.a.i.). As amostras fecais foram analisadas utilizando-se o método de centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco a 33% (densidade 1,180) (FAUST et al., 1938).

Para a coleta das fezes, os animais foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas previamente higienizadas com hipoclorito de sódio 1% e enxaguadas com água mineral, por período de duas horas. O total de fezes eliminadas durante este período foi coletado e homogeneizado em 10mL de água destilada e depois filtrado e centrifugado por 1 minuto à 1500 x g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em

água destilada, completando o volume de 10 mL e novamente centrifugado. Foram realizadas centrifugações, até a obtenção de sobrenadante claro, o qual foi descartado e o sedimento ressuspense em solução de sulfato de zinco até completar o volume de 10 mL, sendo realizada nova centrifugação a 1500 x g por 2 minutos. Após este período, completou-se o tubo até a superfície com a mesma solução, colocando-se, lamínula sobre a borda do tubo e deixando-o em repouso por 10 minutos. A lamínula foi depositada sobre lâmina com uma gota de lugol e, em seguida, observada ao microscópio óptico Olympus CH-2 (Olympus, Japão), nas objetivas de 10x e 40x. Três lâminas de cada amostra foram analisadas para averiguar a presença de cistos ou trofozoítos de *G. duodenalis*.

3.5 Determinação do número de cistos eliminados

Confirmando-se a positividade para cistos, estes foram quantificados pelo método de flutuação em gradiente de sacarose proposto por Roberts-Thomson et al. (1976) com modificações.

A quantidade total de cistos eliminados por cada animal durante duas horas foi diluída em água destilada na proporção de 1:5. Essa solução foi filtrada em gaze dobrada por quatro vezes e centrifugada por 5 minutos a 1500 x g. O procedimento foi repetido até a obtenção de sobrenadante claro. Este foi descartado e o sedimento ressuspense em 3 mL de água destilada. Após a homogeneização do sedimento, foi adicionado ao tubo 3 mL de solução de sacarose 1M e centrifugado a 500 x g, durante 20 minutos. Após a centrifugação, os cistos concentrados na interfase água-sacarose foram transferidos para outro tubo e centrifugados com água destilada por 10 minutos a 1500 x g. O sedimento obtido foi ressuspense em 3 mL de água destilada. Em outro tubo de 10 mL, foram adicionados 3 mL de solução de sacarose 0,75M e os 3 mL da solução de cistos previamente obtida. Essa solução foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos. Os cistos foram retirados, cuidadosamente, da interfase água-sacarose, ressuspensos e centrifugados duas vezes em água destilada para a retirada da sacarose. O último sedimento obtido, foi ressuspense em 1mL de água destilada para a realização da contagem do número total de cistos em câmara de Newbauer.

3.6 Preparo do antígeno solúvel de trofozoítos de *Giardia duodenalis*

O antígeno solúvel de *G. duodenalis* foi preparado conforme metodologia descrita por Yanke et al. (1998), com modificações. Os frascos contendo trofozoítos foram submetidos a

banho de gelo por 20 minutos, para deslocamento dos trofozoítos da parede do tubo, centrifugados por 10 minutos a 500 x *g* e o sedimento ressuspenso em PBS estéril e gelado. Este procedimento de lavagem foi repetido 5 vezes e último sedimento foi ressuspenso em 3ml de PBS, acrescido dos inibidores de proteases - 1,6 mM Fluoreto de Fenilmetanosulfonila – PMSF (Sigma Chemical Co., MO, USA); 100 µg/mL Leupeptina (Sigma Chemical Co.) e 10 µg/mL Aprotinina (Sigma Chemical Co.). Em seguida, foram realizados 10 ciclos de congelamento em N₂ líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C. O extrato antigênico foi submetido a 6 ciclos de 1 minuto em ultra-som, em banho de gelo, seguidos por centrifugação a 10000 x *g*, 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica determinada pelo método de Lowry (1951).

3.7 Obtenção do soro

Amostras sangüíneas de cada animal foram coletadas por punção retro-orbital com tubos capilares para micro-hematócrito (sem heparina). Após aplicação de colírio anestésico (Sulfato de Condroitina A 20g associado a Ciprosloxacina 0,3g) diluído em soro fisiológico (1:10), a primeira coleta foi realizada sete dias antes da inoculação (dia -7), a segunda no dia do inóculo (dia 0) e as posteriores com intervalos de sete dias, durante 6 semanas consecutivas. As amostras foram centrifugadas a 3.000 x *g* por 10 min para obtenção dos soros, que foram estocados a -20°C até o momento do uso.

3.8 Obtenção de extratos fecais

No mesmo dia em que foram coletadas as amostras sangüíneas, as amostras fecais de cada animal foram obtidas para o preparo do extrato fecal. Coletou-se 0,1 g de fezes de cada animal e foram adicionadas em microtubos de poliestireno contendo 0,5 mL de PBS e 1 mM de Fluoreto de Fenilmetanosulfonila - PMSF (Sigma Chemical Co.). Após incubação por 1h a 4°C, os tubos foram vortexados e centrifugados a 10.000 x *g* a 4°C por 10 min para remoção do material insolúvel. O sobrenadante (extrato fecal) foi coletado e estocado a -20° C, até o momento do uso.

3.9 Detecção dos Anticorpos Séricos IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgM e IgE específicos a *G. duodenalis*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para determinar os níveis de anticorpos IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgM, IgE específicos a *G. duodenalis* nas amostras de soro dos gerbils infectados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos.

Todos os passos descritos abaixo foram previamente padronizados, sendo utilizado como controle positivo no ELISA, amostras de soro de 4 gerbils adicionais, inoculados com 10⁶ trofozoítos com idade e peso comparáveis aos demais. Neste ensaio, utilizou-se anticorpos secundários anti-camundongo, baseando-se em resultados obtidos por Stibbs et al. (1990).

Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar/Corning – 3590, Costar, Corning, N.Y., USA) foram sensibilizadas com 10 µg/mL (50 µL/poço) de extrato solúvel de *G. duodenalis* diluídos em PBS e incubadas por 18h a 4°C. Após três lavagens, as placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T) acrescido de BSA a 1% por 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas (3x) e incubadas com amostras de soro por 1h a 37°C, em duplicata. Após 1h de incubação para IgM e 2h para os demais anticorpos secundários biotinilados produzidos em cabra (50 µL/poço), as placas foram lavadas (6x) e adicionados 50 µL/poço de estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluídos em mesmo diluente utilizado para o anticorpo secundário e incubados por 30 min a 37° C. A reação para detecção de IgA, IgE, IgG₁ e IgG_{2a} séricas foi revelada com o substrato 3,3',5,5'- TetraMetilBenzidina (TMB – Sigma Chemical Co.) e H₂O₂ 0,03% e finalizada com H₂SO₄2N. Os valores de D.O. (densidade óptica) foram mensurados em leitor de microplacas – microtitulação (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, USA) a 450 nm. Para IgM, a reação foi revelada com ABTS {[2,2' azino-bis (ácido sulfônico 3 etilbenzotiazolina)] - Sigma Chemical Co.} e H₂O₂ 0,03% e os valores de D.O. foram determinados a 405 nm.

Na tabela 1 estão representadas as diluições das amostras de soro, anticorpos secundários e estreptavidina-peroxidase e seus respectivos diluentes utilizados para a realização do ensaio imunoenzimático.

Tabela 1: Diluições das amostras de soro, anticorpos secundários e estreptavidina-peroxidase e seus respectivos diluentes utilizados para a realização do ensaio imunoenzimático.

	IgA sérica	IgG1	IgG2a	IgM	IgE
Diluyente do soro	PBS-T	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%
Diluição do soro	1:50	1:10	1:10	1:20	1:10
Diluyente do anticorpo secundário	PBS-T	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%	PBS-T
Diluição do anticorpo secundário	1:5000	1:2500	1:2500	1:10000	1:250
Diluyente da estreptavidina-peroxidase	PBS-T	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%	PBS-T BSA 1%	PBS-T
Diluição da estreptavidina-peroxidase	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000

3.10 Detecção de IgA secretora no extrato fecal

Os níveis de IgA secretora específica a *G. duodenalis* foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em amostras de extrato fecal. Semelhante aos anticorpos séricos, todos os passos necessários para determinar a IgA fecal, foram previamente padronizados, utilizando-se extratos fecais dos animais inoculados com 10^6 trofozoítos e anticorpo anti-IgA de camundongo.

Placas de microtitulação de alta afinidade (Costar/Corning – 3590) foram sensibilizadas com 10 µg/mL (50 µL/poço) de extrato solúvel de *G. duodenalis* diluídos em PBS e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas 3x com PBS – 0,05% Tween 20 (PBST) e bloqueadas por 1h a 37°C com 100 µL/poço de 0,5% gelatina em PBS e em seguida, lavadas (3x) e incubadas com 50 µL/poço de amostras de extrato fecal, em duplicata, por 1h a 37°C. Após lavagem (3x), 50 µL/poço de anticorpo biotilado anti-IgA de camundongo produzido em cabra (Caltag Lab. Inc.) foi adicionado e incubado por 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas (6x) e 50 µL/poço de estreptavidina-peroxidase foram incubados por 30 min a 37°C. A reação foi revelada com o substrato TMB e H₂O₂ e finalizada com H₂SO₄. Os valores de D.O. foram mensurados em leitor de ELISA a 450 nm.

Na tabela 2 estão representadas as diluições das amostras de extratos fecais, anticorpo secundário e estreptavidina-peroxidase e seus respectivos diluentes utilizados para a realização do ensaio imunoenzimático.

Tabela 2: Diluições das amostras de extratos fecais, anticorpo secundário e estreptavidina-peroxidase e seus respectivos diluentes utilizados para a realização do ensaio imunoenzimático.

	IgA fecal
Diluyente do extrato fecal	PBS-T
Diluição do extrato fecal	1:5
Diluyente do anticorpo secundário	PBS-T
Diluição do anticorpo secundário	1:1000
Diluyente da estreptavidina-peroxidase	PBS-T
Diluição da estreptavidina-peroxidase	1:1000

3.11 Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/Imunossupressão

Essa etapa experimental foi realizada com os animais da infecção primária que foram submetidos à reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão, avaliando a cinética da resposta imune sistêmica e secretora desses gerbils.

Para isso, no 45º dia após inoculação primária e quando, não mais se observava cistos nas fezes, os gerbils de cada grupo foram redistribuídos em quatro subgrupos, contendo dois animais cada. Para cada grupo foram separados dois animais, utilizados como controle nessa etapa, que receberam apenas 1 mL de PBS. Essa etapa durou 42 dias, totalizando 87 dias experimentais.

Para avaliação da reinfecção, dois animais de cada grupo foram inoculados com a mesma dose de trofozoítos recebida na infecção primária (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5), seguindo os mesmos procedimentos de inoculação descritos anteriormente.

Para imunossupressão, outros dois animais de cada grupo receberam dose única de Acetato de MetilPrednisolona – MPA (Depo-Medrol®) - 600 mg/Kg, por via subcutânea (MILLER; SCHAEFER, 2007).

Na avaliação da reinfecção/imunossupressão, dois animais de cada grupo foram reinfectados com a mesma dose de trofozoítos recebida na infecção primária e, concomitantemente, receberam dose única de Acetato de MetilPrednisolona – MPA (Depo-Medrol®) - 600 mg/Kg, por via subcutânea.

Todos os animais foram novamente submetidos a exames coproparasitológicos diários, coletas sangüíneas e fecais semanais, utilizando metodologia descrita anteriormente, até o 42º dia após reinfecção, imunossupressão ou reinfecção/imunossupressão. Os dados obtidos pelos animais dias após esses tratamentos, foram comparados com os dados obtidos pelos animais controle (primo-infectados) dessa etapa.

3.12 Variação da massa corpórea dos animais na Infecção Primária, Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/Imunossupressão

A massa corpórea dos animais selecionados para o experimento foi de aproximadamente 60 gramas (dia 0). Estes foram novamente pesados após 45 e 91 dias após a inoculação.

3.13 Análise Estatística

Para a comparação dos dados obtidos em relação à cinética de eliminação de cistos entre os grupos, para comparar os níveis de anticorpos em todos os grupos infectados entre si e destes com o grupo controle e para comparar a massa corpórea dos animais pré e pós-tratamentos, foi utilizado ANOVA e o teste Tukey, como teste de comparação múltipla, considerando diferenças significativas com $p < 0,05$. Para obtenção de todos os cálculos utilizou-se o software GraphPad® Prism versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 *Determinação do Período Pré-Patente e Cinética de Eliminação:*

Infecção Primária, Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/ Imunossupressão

Todos os gerbils inoculados com diferentes doses de trofozoítos de *G. duodenalis*, pertencentes ao isolado humano Portland-1 (ATCC: 30888), mostraram-se susceptíveis à infecção primária, condição confirmada pela presença de cistos nas fezes. O grupo controle não eliminou cistos ou trofozoítos durante o período experimental.

Os dados apresentados na figura 1 mostram o início do período patente e a cinética de eliminação de cistos durante a infecção primária. O período pré-patente verificado nos animais inoculados foi de 9 dias para os grupos C e D; 12 dias para o grupo E e 13 dias para A e B. A eliminação de cistos permaneceu intermitente e em quantidade variável até o 21º d.a.i. no grupo D; 22º d.a.i. nos grupos C e E; 26º d.a.i. no grupo A e 27º d.a.i. no grupo B. A maior eliminação ocorreu entre o 12º e 20º d.a.i. (segunda e terceira semanas de infecção), sendo que nos grupos A e B, entre o 16º e 20º d.a.i.; no grupo C, entre o 12º e 19º d.a.i. e para os grupos D e E, entre o 12º e 17º d.a.i. A partir do 27º d.a.i. não foram encontrados cistos nas amostras fecais desses animais, sendo este perfil mantido até o fim do experimento.

Na figura 2 está representada a média do número total de cistos eliminados por cada grupo inoculado, durante o período patente na infecção primária. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$), embora os inoculados com maiores doses (C, D, E) eliminaram quantidades mais elevadas de cistos em relação aos grupos inoculados com doses menores (A, B).

Todos os animais reinfetados com as mesmas doses de trofozoítos de *G. duodenalis* inoculadas na infecção primária não voltaram a eliminar cistos ou trofozoítos nas fezes.

Os gerbils da infecção primária submetidos à imunossupressão voltaram a eliminar cistos nas fezes (Figura 3). A partir do primeiro dia após a imunossupressão (d.a.im.), observa-se a presença de cistos de *G. duodenalis* nas amostras fecais de todos os animais. A eliminação de cistos permaneceu intermitente e em quantidades elevadas, até o 30º d.a.im., nos grupos A (10^1), B (10^2) e E (10^5) e até o 38º e 39º dia nos grupos D (10^4) e grupo C (10^3), respectivamente. Após o 40º d.a.im. não foram encontrados cistos nas fezes dos animais. A maior eliminação de cistos ocorreu entre as duas primeiras semanas após a imunossupressão,

sendo no grupo E, entre o 6º e 9º d.a.im.; no C e D, entre o 6º e 10º d.a.im.; no B, entre o 7º e 12º d.a.im. e no A, entre o 9º e 14º d.a.im.

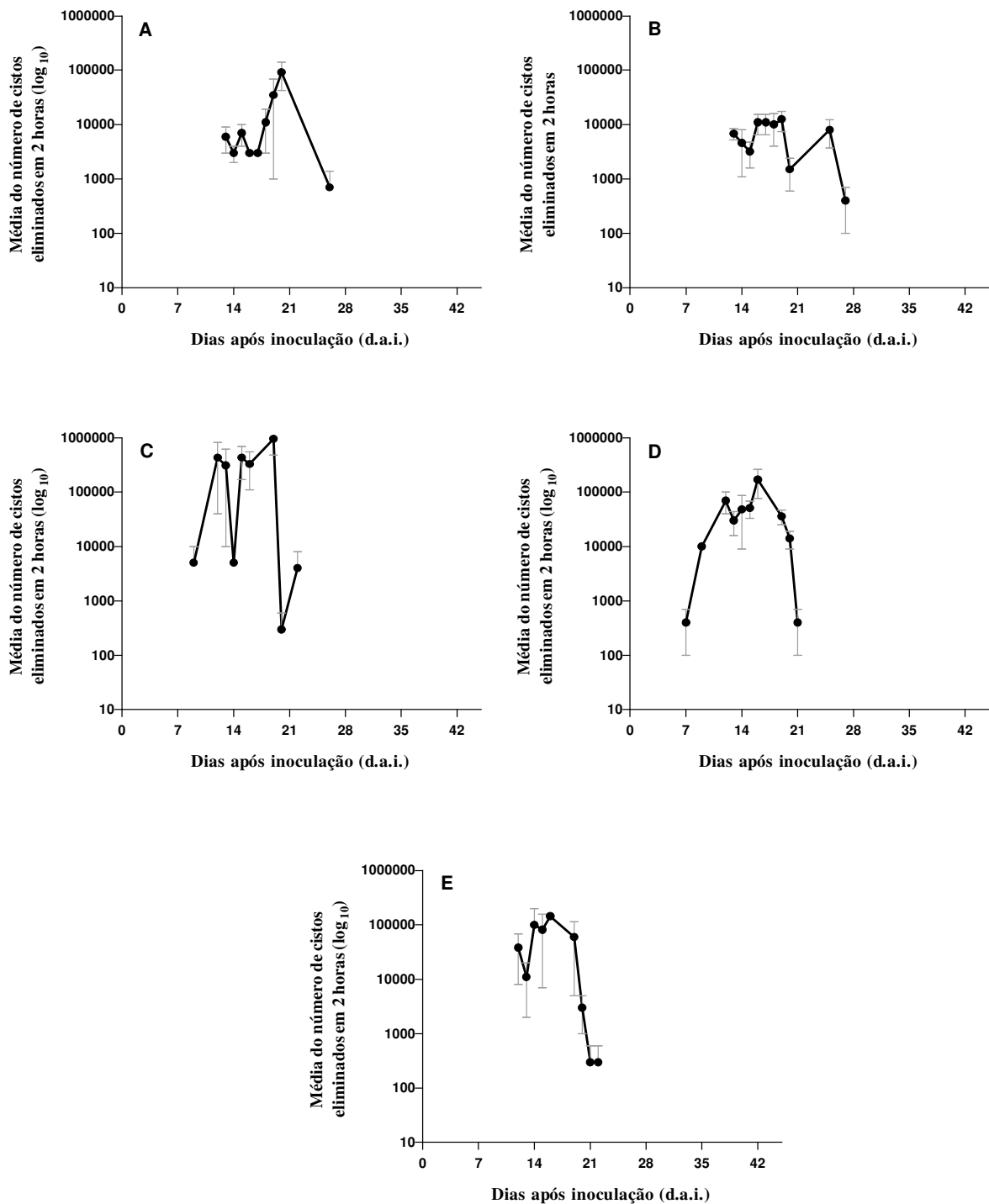


Figura 1. Período pré-patente e cinética da eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* durante a infecção primária em gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos (ATCC: 30888). Cada ponto representa a média diária de cistos eliminados pelos 8 animais de cada grupo. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10¹ trofozoítos), B (10² trofozoítos), C (10³ trofozoítos), D (10⁴ trofozoítos), E (10⁵ trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

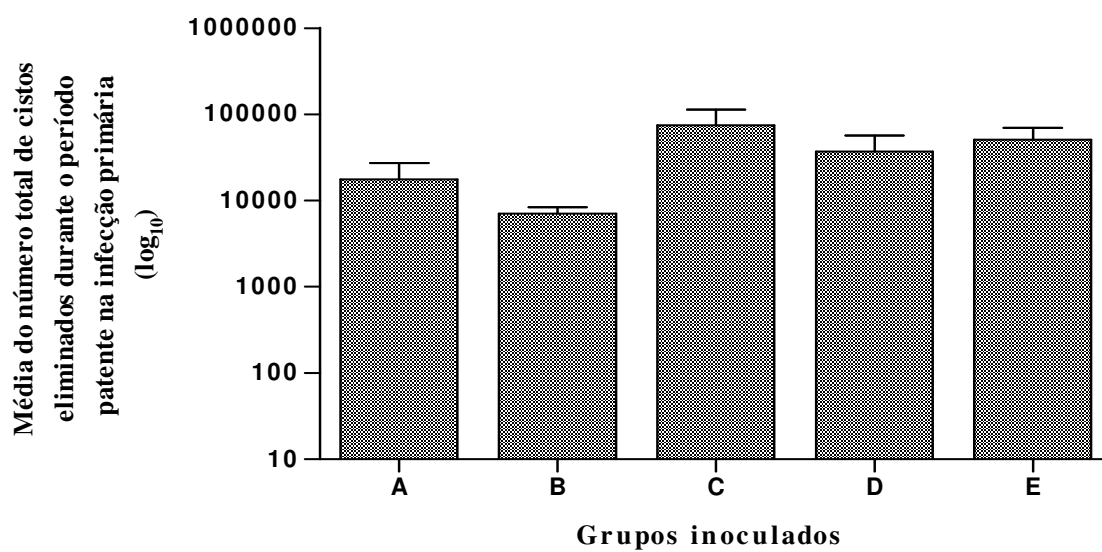


Figura 2. Média do número total de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados, por cada grupo inoculado, durante o período patente na infecção primária. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

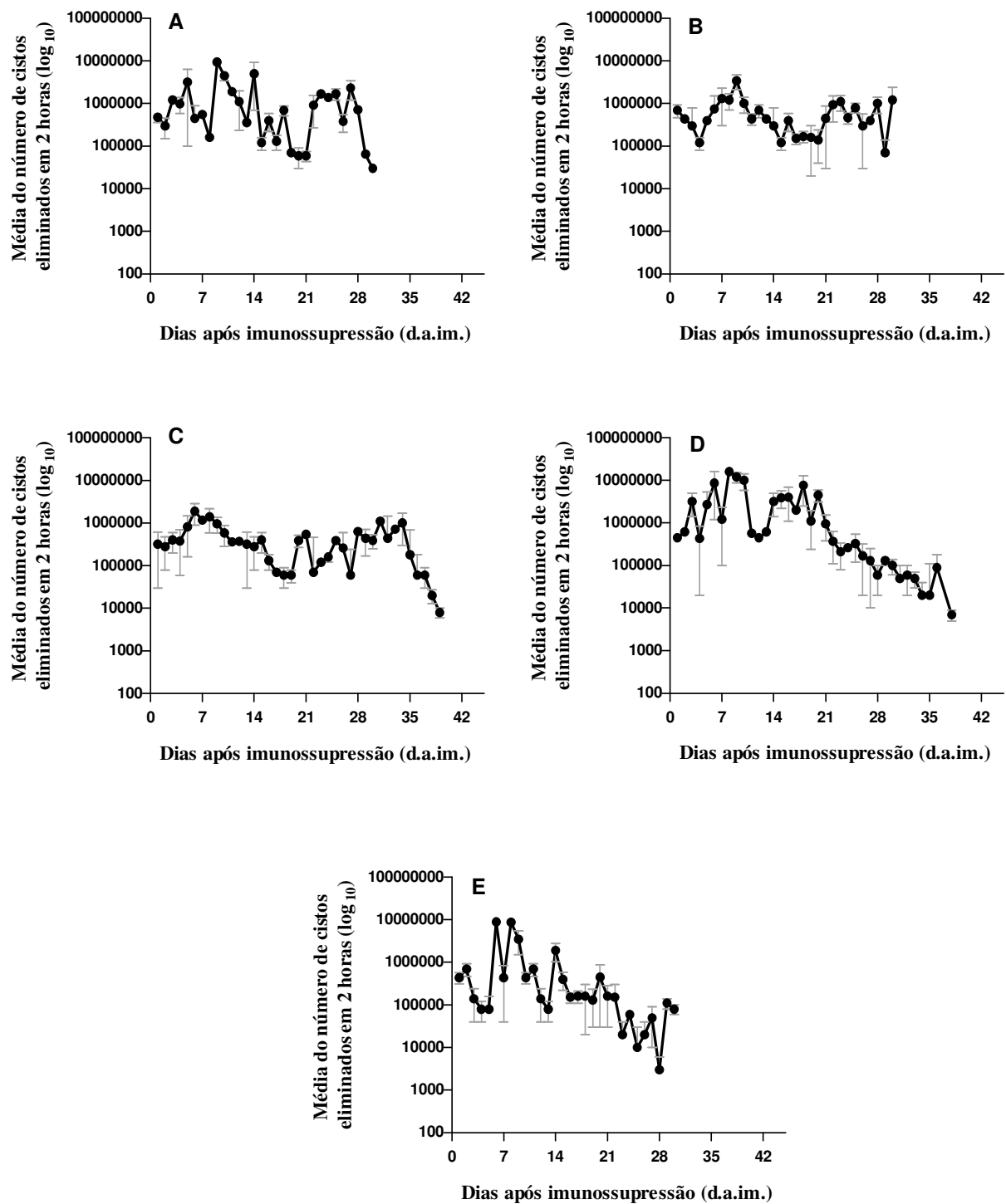


Figura 3. Cinética de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* após a imunossupressão de gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos na infecção primária. Cada ponto representa a média diária de cistos eliminados pelos 2 animais de cada grupo. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10¹ trofozoítos), B (10² trofozoítos), C (10³ trofozoítos), D (10⁴ trofozoítos), E (10⁵ trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes na comparação entre as médias do total de cistos eliminados por cada grupo após os animais serem imunossuprimidos (Figura 4).

Os dados apresentados na figura 5 mostram a cinética de eliminação de cistos pelos gerbils após a reinfecção/imunossupressão. Os gerbils foram reinfetados com a mesma dose de trofozoítos de *G. duodenalis* inoculada na infecção primária e, tratados no mesmo dia, com dose única de MPA. A partir do primeiro dia após a reinfecção e tratamento com MPA, observa-se a presença de cistos de *G. duodenalis* nas amostras fecais de todos os animais. A eliminação de cistos permaneceu intermitente e em quantidades elevadas até 31 dias após a reinfecção/imunossupressão no grupo C; 34 dias no grupo E; 36 dias no grupo D; 37 dias no grupo A e 38 dias no grupo B. Após esse período, não foram encontrados cistos nas fezes dos animais.

A figura 6 representa a média do número total de cistos eliminados por cada grupo inoculado após a reinfecção/imunossupressão, não sendo verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, observa-se que os grupos C e D eliminaram mais cistos comparados aos demais.

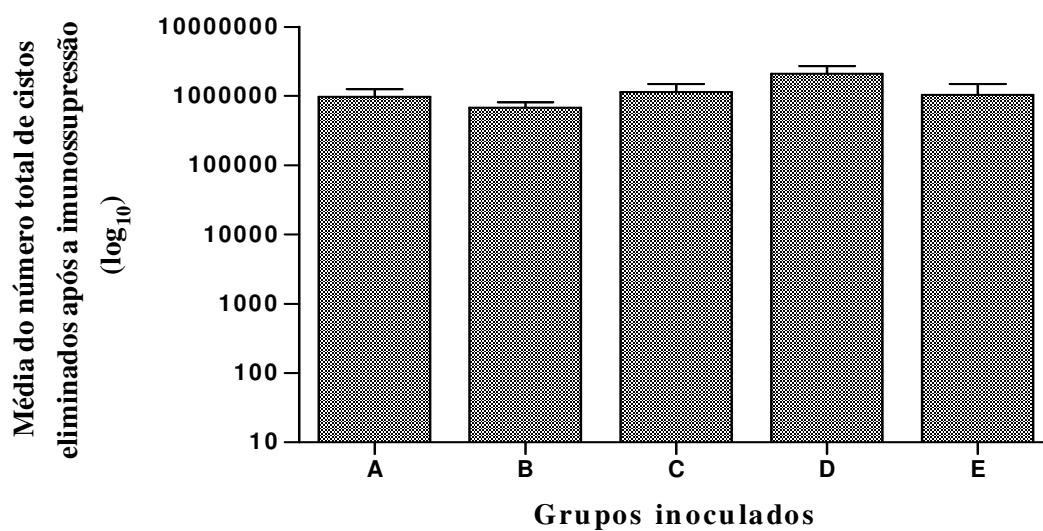


Figura 4. Média do número total de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados por cada grupo inoculado anteriormente e imunossuprimidos com Acetato de MetilPrednisolona (MPA). Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

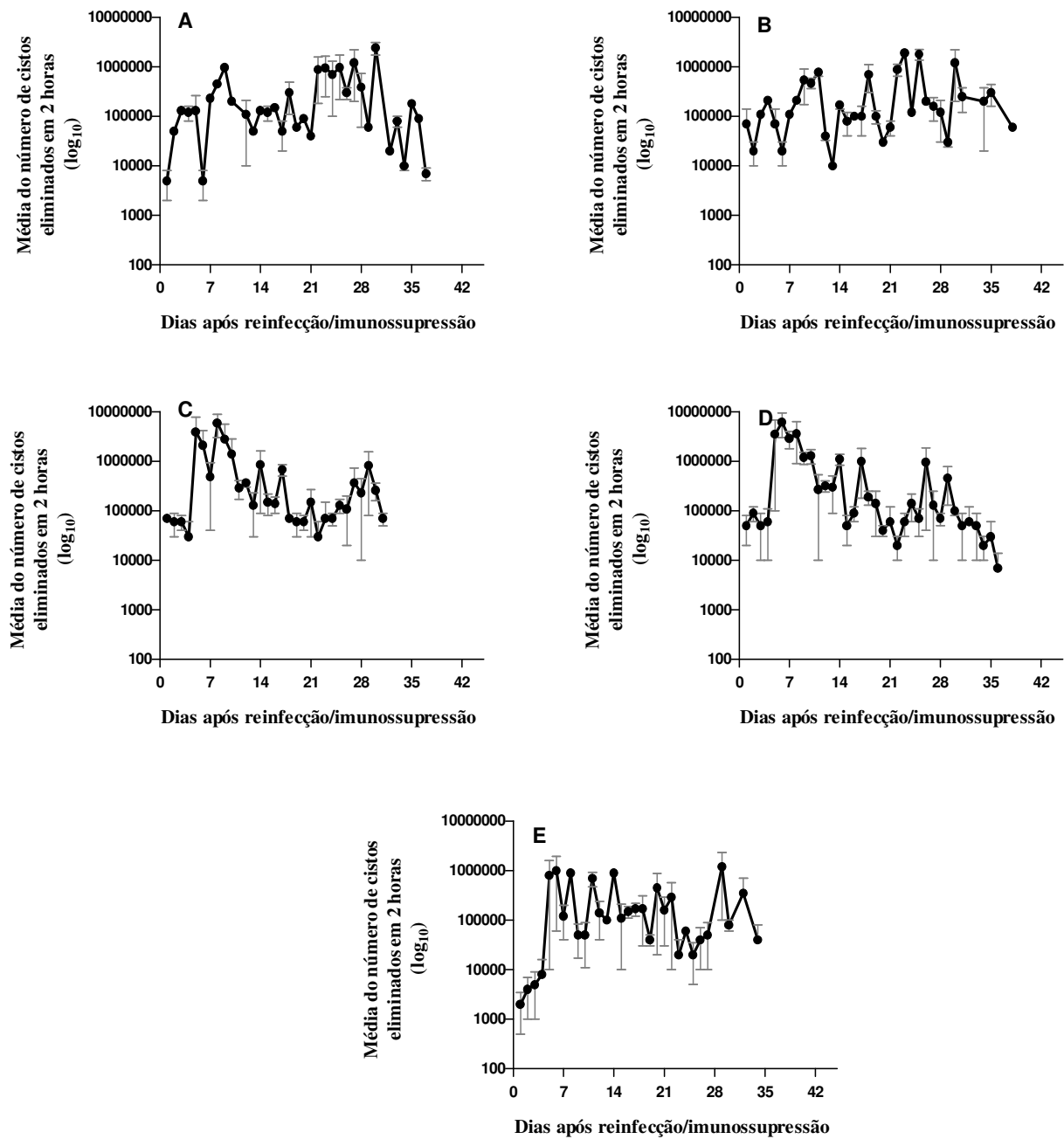


Figura 5. Cinética de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* em gerbils após a reinfecção com a mesma dose de trofozoítos inoculada na infecção primária e imunossupressão com MPA. Cada ponto representa a média diária de cistos eliminados pelos 2 animais de cada grupo. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10¹ trofozoítos), B (10² trofozoítos), C (10³ trofozoítos), D (10⁴ trofozoítos), E (10⁵ trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

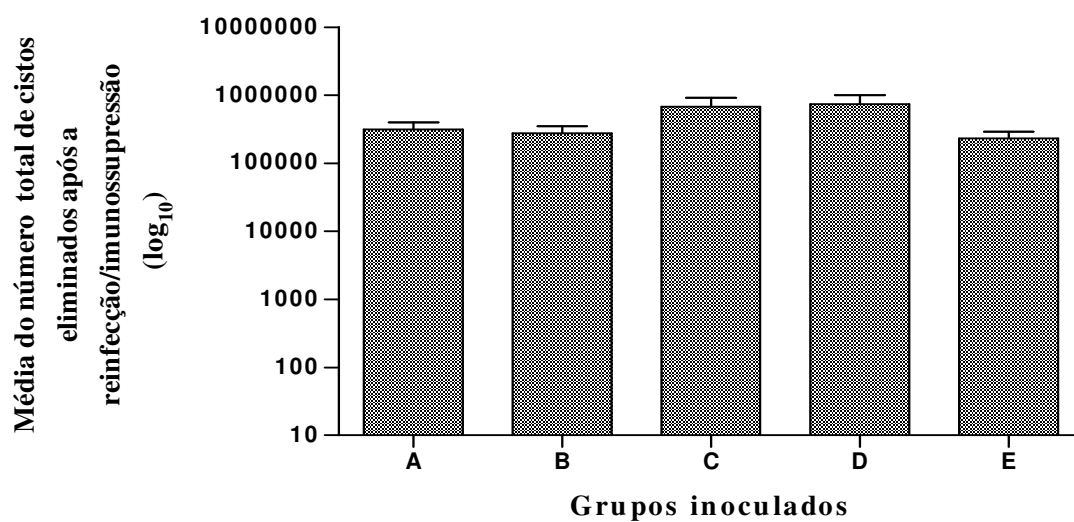


Figura 6. Média do número de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados após a reinfecção e imunossupressão com Acetato de MetilPrednisolona (MPA) em gerbils (*Meriones unguiculatus*) em relação ao inóculo de trofozoítos. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

4.2 Análise sorológica:

Infecção Primária, Reinfecção, Imunossupressão e Reinfecção/Imunossupressão

4.2.1 IgA fecal

Na infecção primária, os níveis de anticorpos IgA fecais específicos a *G. duodenalis* começaram a ser detectados a partir do 7º d.a.i., observando diferença estatisticamente significativa nos grupos inoculados entre si e grupo controle no 14º d.a.i. ($p < 0,001$). Observa-se detecção máxima de IgA fecal nos grupos D (10^4) e E (10^5) no 35º d.a.i. e 42º d.a.i., respectivamente (Figura 7 a). Os níveis de IgA fecal nos grupos B (10^2), C (10^3) e E (10^5) diminuíram a partir do 45º d.a.i., ao contrário dos níveis nos grupos A (10^1) e D (10^4), que elevaram-se até o 52º d.a.i. com posterior queda até o 87º d.a.i. ($p < 0,001$) (Figura 7 b).

Entre o 7º e o 14º dia após a reinfecção (d.a.r.), observa-se que todos os grupos inoculados apresentaram níveis máximos de IgA fecal, com gradativa redução até o 42º d.a.r. Os níveis de anticorpos detectados foram mais elevados nos grupos C, D e E ($p < 0,001$) (Figura 7 c).

Os níveis de IgA fecal após a imunossupressão reduziram em todos os grupos experimentais até o 28º d.a.im., com posterior elevação, sendo detectados níveis mais altos no 35º e 42º d.a.im., mostrando-se estatisticamente significantes ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle (Figura 7 d).

Após a reinfecção/imunossupressão, os níveis de IgA fecal reduziram até o 28º dia, em todos os grupos. No 35º dia, verifica-se leve aumento nos níveis desse anticorpo, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 7 e).

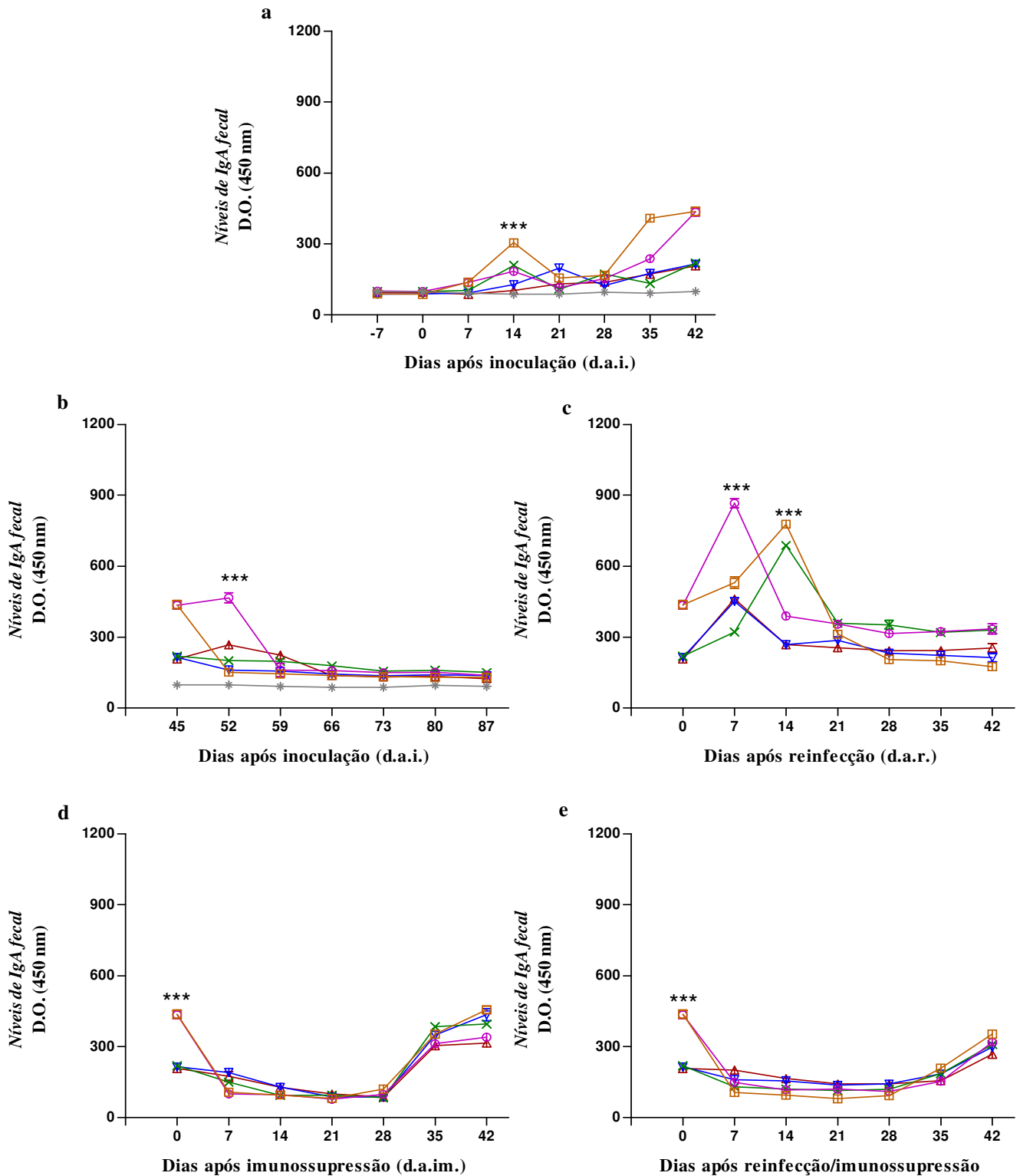


Figura 7. Cinética da resposta imune humoral secretora intestinal (IgA fecal) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10¹, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵) —△— A (10¹ trofozoítos) —▽— B (10² trofozoítos) —×— C (10³ trofozoítos) —○— D (10⁴ trofozoítos) —□— E (10⁵ trofozoítos) —*— F (PBS). (***) p < 0,001.

4.2.2. IgA sérica

Na infecção primária, observa-se que o início da detecção de IgA sérica ocorreu no 28º d.a.i. em todos os grupos inoculados, com níveis mais elevados no 35º para o grupo B, 52º para o D e 59º para o E, sendo estatisticamente significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). A partir do 59º d.a.i., observou-se redução nos níveis de IgA sérica nos grupos D e E. Os demais grupos apresentaram níveis mais baixos, sendo observado pequenas oscilações ao longo do período experimental (Figura 8 a, b).

Os grupos C, D e E apresentaram aumento significativo de IgA sérica após a reinfecção ($p < 0,001$), com picos no 21º, 14º e 7º d.a.r., respectivamente. Nos grupos A e B, foram detectados níveis moderados até o 42º d.a.r., sendo observado significância estatística quando comparados aos animais primo infectados ($p < 0,001$) (Figura 8 c).

Na imunossupressão, observa-se que os níveis de IgA sérica mantiveram-se baixos e oscilantes até o 21º d.a.im. para todos os grupos, seguido, a partir do 28º d.a.im., de aumento moderado em sua produção ($p < 0,05$) (Figura 8 d).

Na reinfecção/imunossupressão, observa-se que todos os grupos apresentaram níveis de IgA sérica até o 21º dia. Entretanto, a partir do 28º dia, mostram leve aumento até o 42º dia após reinfecção/ imunossupressão ($p < 0,05$) (Figura 8 e).

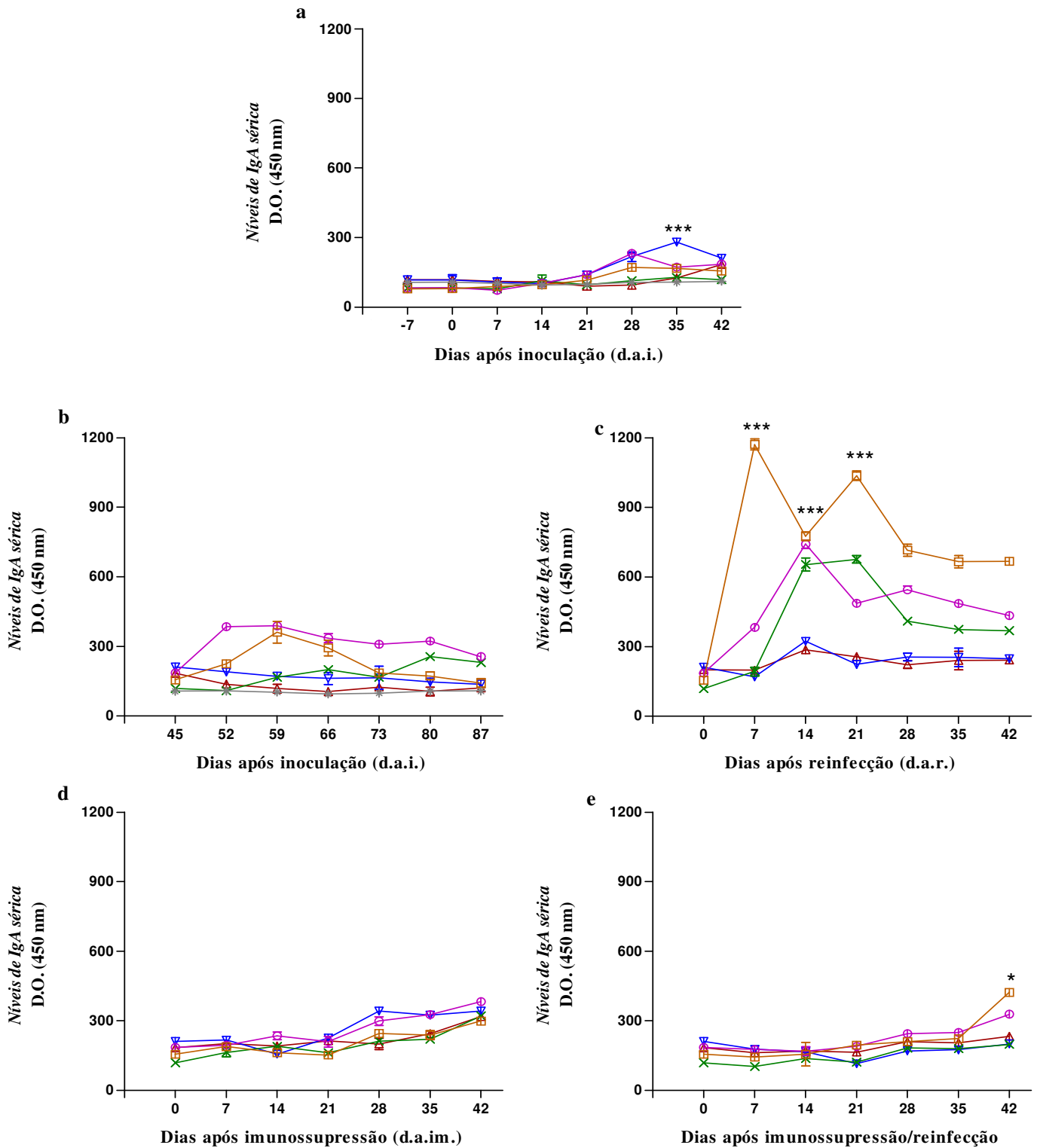


Figura 8. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgA sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. **(a)** Infecção primária (até 42 d.a.i.) **(b)** Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) **(c)** Reinfecção **(d)** Imunossupressão **(e)** Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10¹, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵) —△— A (10¹ trofozoítos) —▽— B (10² trofozoítos) —×— C (10³ trofozoítos) —○— D (10⁴ trofozoítos) —□— E (10⁵ trofozoítos) —*— F (PBS). (*) $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$.

4.2.3. IgG₁ sérica

Na infecção primária, os níveis de anticorpos IgG₁ séricos mostraram aumento a partir do 7º d.a.i. para os grupos D e E. Após o 28º d.a.i., elevação foi observada, em todos os grupos, com diferenças estatísticas no 35º, 42º e 45º d.a.i. nos grupos inoculados entre si e o controle ($p < 0,001$). Todos os grupos apresentaram queda nos níveis de IgG₁ até 66º d.a.i. e mantiveram-se moderados e constantes até o 87º d.a.i. (Figura 9 a, b).

Na reinfecção, os títulos de anticorpos IgG₁ séricos, em todos os grupos inoculados, mostraram-se elevados e oscilantes até o 42º d.a.r., sendo observadas diferenças significativas entre os grupos D e E em relação aos demais no início da reinfecção e entre os grupos C e A em relação aos outros grupos no 28º e 35º d.a.r. ($p < 0,01$) (Figura 9 c).

Os níveis de anticorpos IgG₁ séricos, após a imunossupressão, mantiveram-se elevados e oscilantes até o 42º d.a.im. em todos os grupos ($p < 0,05$) (Figura 9 d).

Na reinfecção/imunossupressão, os níveis de anticorpos IgG₁ séricos detectados nos grupos C, D e E apresentaram-se superiores aos grupos A e B, sendo observada oscilações durante o período experimental ($p < 0,01$) (Figura 9 e).

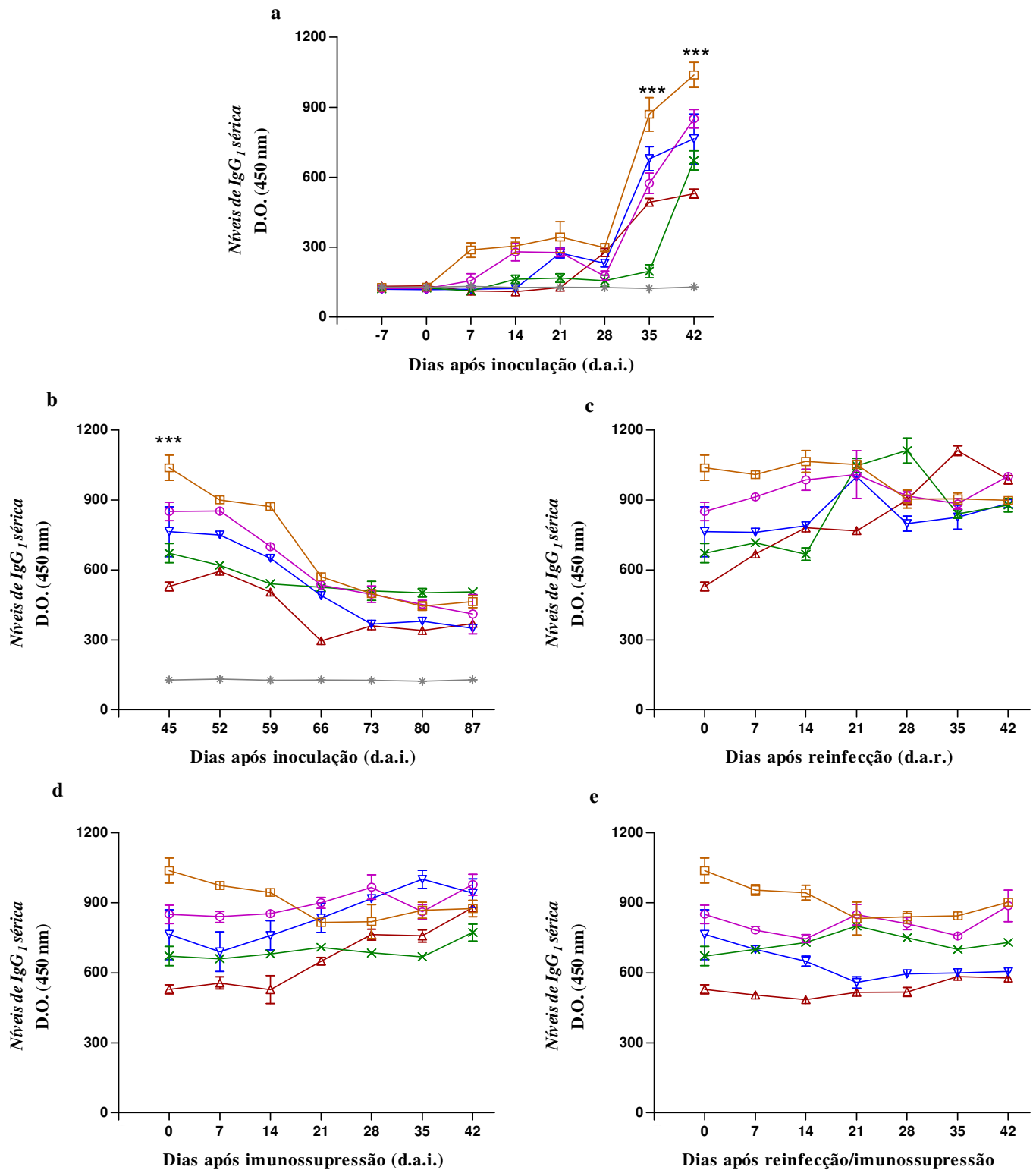


Figura 9. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgG₁ sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. **(a)** Infecção primária (até 42 d.a.i.) **(b)** Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) **(c)** Reinfecção **(d)** Imunossupressão **(e)** Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —△— A (10^1 trofozoítos) —▽— B (10^2 trofozoítos) —×— C (10^3 trofozoítos) —○— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$.

4.2.4. IgG_{2a} sérica

Em todos os grupos inoculados na infecção primária observa-se produção moderada de anticorpos IgG_{2a}, a partir do 21º d.a.i., com oscilações até o 42º d.a.i. (Figura 10 a) Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos inoculados ($p > 0,05$). A partir do 45º d.a.i., os níveis de IgG_{2a} em todos os grupos mantiveram-se moderados e variáveis até o 87º d.a.i. (Figura 10 b).

A produção de anticorpos IgG_{2a} elevou-se após a reinfecção e manteve-se até o fim do experimento. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos na maioria dos dias experimentais ($p < 0,05$) (Figura 10 c).

Na imunossupressão, observa-se produção de IgG_{2a} sérica, do 7º até o 42º d.a.im. em todos os grupos inoculados ($p < 0,01$) (Figura 10 d).

Os animais reinfectedos/imunossuprimidos apresentaram níveis elevados e significantes de IgG_{2a} sérica ($p < 0,01$), a partir do 7º até o 42º dia após reinfecção/imunossupressão. Os demais apresentaram níveis baixos, desse anticorpo, ao longo dos 42 dias de reinfecção/imunossupressão, não havendo diferenças significativas ($p > 0,01$) (Figura 10 e).

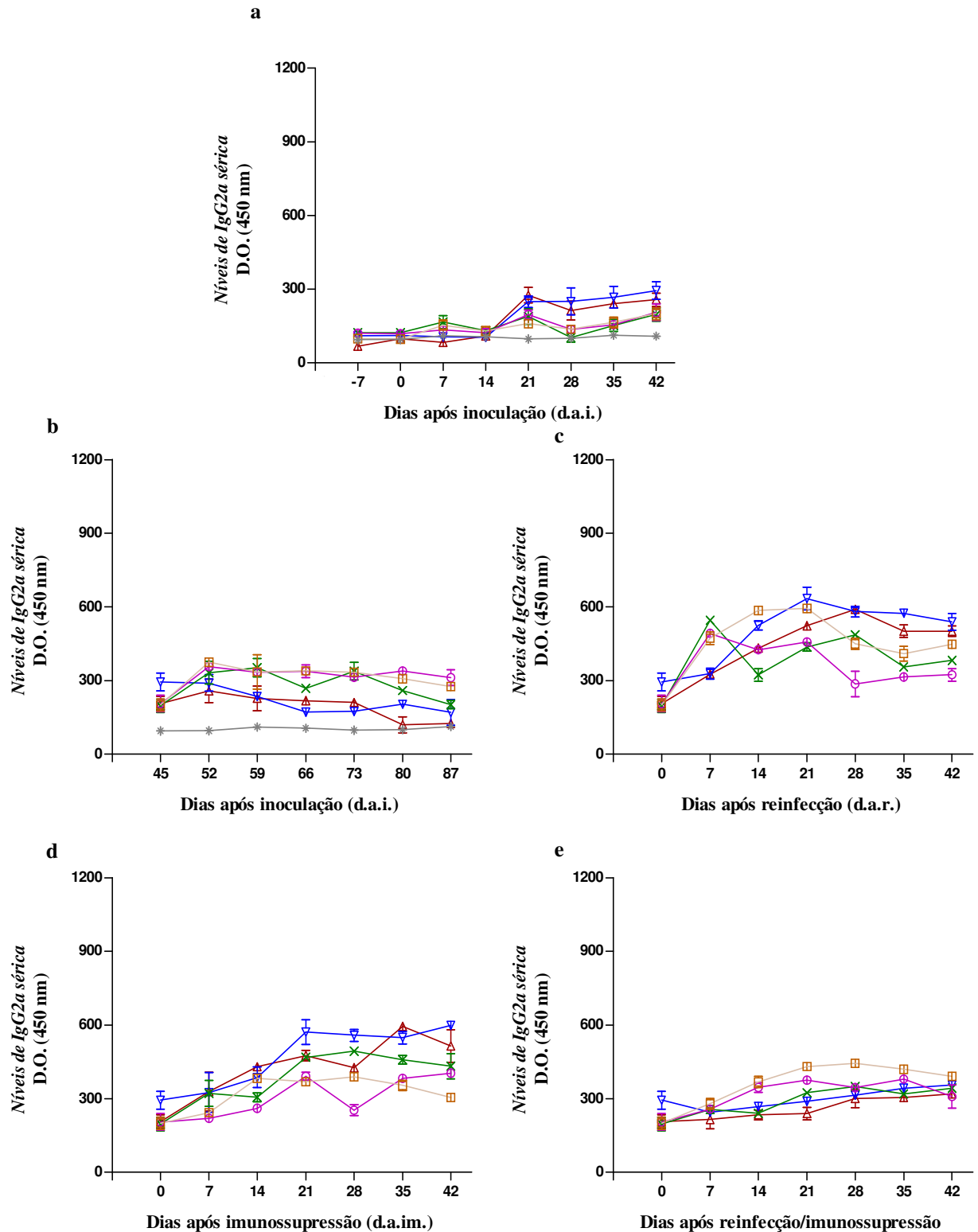


Figura 10. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgG_{2a} sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45° e 87° d.a.i.) (c) Reinfecção (d) Imunossupressão (e) Reinfecção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —△— A (10^1 trofozoítos) —▽— B (10^2 trofozoítos) —×— C (10^3 trofozoítos) —◇— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS).

4.2.5. IgM sérica

Os níveis de IgM sérica se elevaram a partir do 7º d.a.i. em todos os grupos na infecção primária, sendo observado pico máximo no 14º d.a.i., seguido de queda acentuada e mantendo níveis estatisticamente significantes acima do grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 11 a). Após esse período, os níveis desse anticorpo se mantiveram baixos até o 87º d.a.i. (Figura 11 b).

Os níveis detectados de IgM sérica após a reinfecção não foram expressivos na maioria dos grupos, exceto o grupo E, que apresentou níveis mais elevados desse anticorpo no 7º d.a.r. ($p < 0,001$) (Figura 11 c).

Na imunossupressão, os níveis de IgM sérica mantiveram-se baixos em todos os grupos, não apresentando diferenças estatísticas significantes entre eles (Figura 11 d).

Os níveis de IgM sérica foram decrescendo levemente, a partir do 7º dia após reinfecção/imunossupressão, não sendo observada variações consideráveis em todos os grupos inoculados até o 42º dia (Figura 11 e).

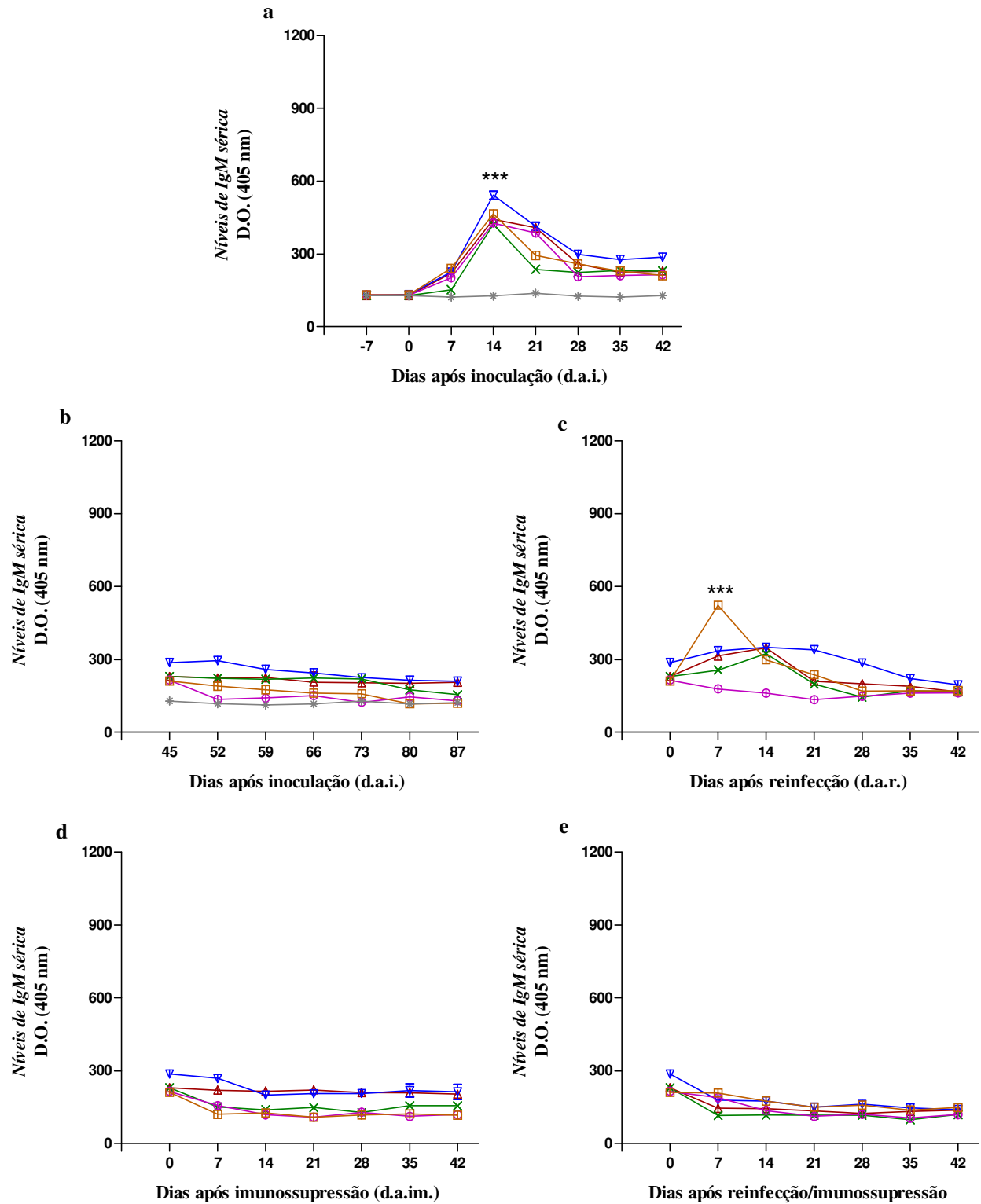


Figura 11. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgM sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. **(a)** Infecção primária (até 42 d.a.i.) **(b)** Infecção primária (entre o 45º e 87º d.a.i.) **(c)** Reinfeção **(d)** Imunossupressão **(e)** Reinfeção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —△— A (10^1 trofozoítos) —▽— B (10^2 trofozoítos) —×— C (10^3 trofozoítos) —○— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$.

4.2.6. IgE sérica

Na infecção primária, observa-se que os níveis de IgE em todos os grupos inoculados não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) até o 87º d.a.i. (Figura 12 a, b).

Nos grupos reinfectedos, os níveis de IgE nos grupos inoculados foram semelhantes ao controle, exceto o grupo E, que apresentou leve aumento no 7º d.a.r., com $p < 0,001$ (Figura 12 c).

Não se observa produção de IgE sérica específica nos grupos após a imunossupressão. Os níveis em todos os grupos se mantiveram baixos até o 42º d.a.im. (Figura 12 d).

Os níveis de IgE sérica, do 7º ao 42º dia após reinfecção/imunossupressão, não demonstraram variações consideráveis em todos os grupos inoculados (Figura 12 e).

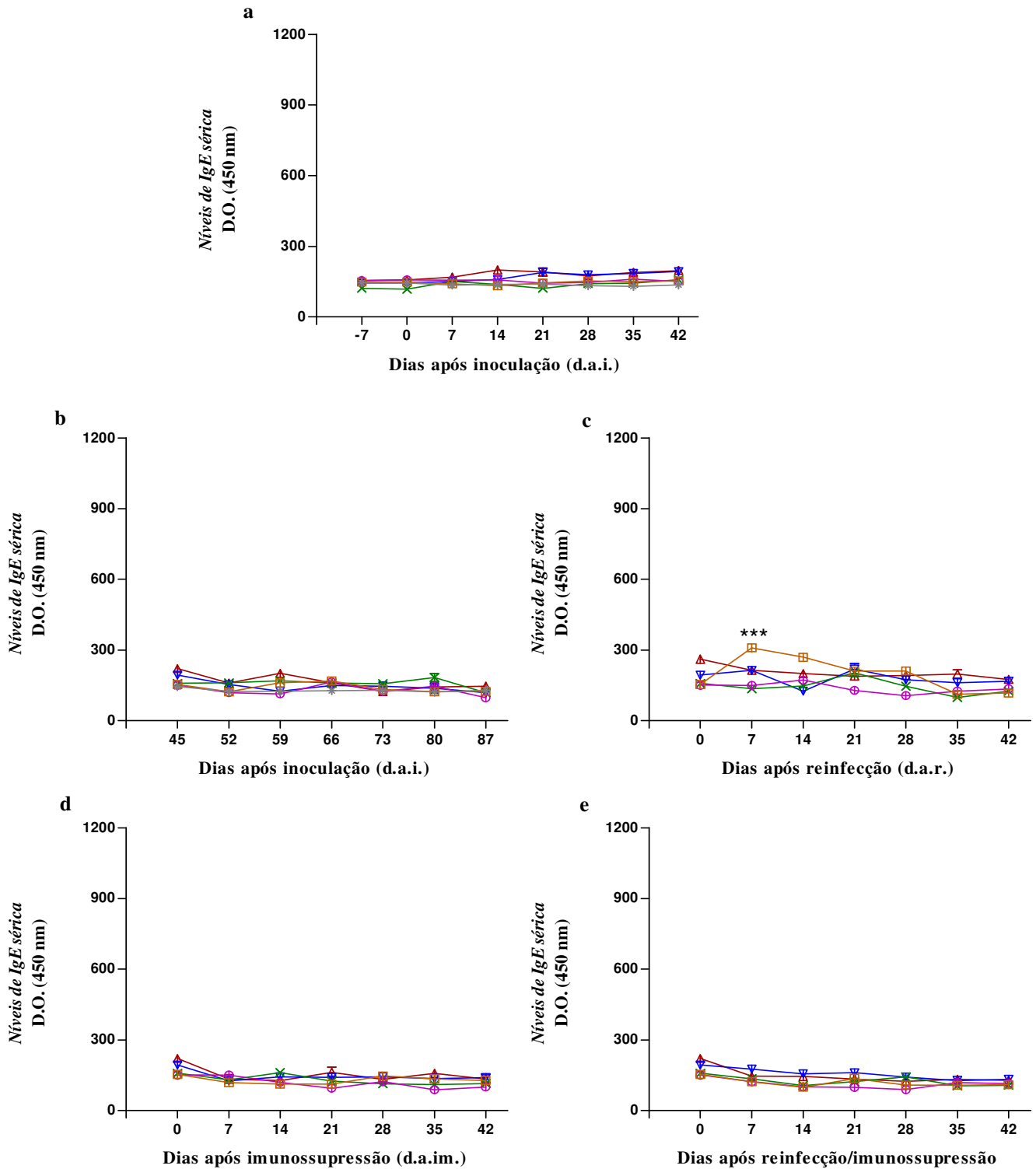


Figura 12. Cinética da resposta imune humoral sistêmica (IgE sérica) em gerbils inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, avaliada pelo ELISA. (a) Infecção primária (até 42 d.a.i.) (b) Infecção primária (entre o 45º e 87º d.a.i.) (c) Reinfeção (d) Imunossupressão (e) Reinfeção/Imunossupressão. Símbolos representam a média da densidade óptica de cada grupo inoculado com diferentes doses de trofozoítos (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5) —△— A (10^1 trofozoítos) —▽— B (10^2 trofozoítos) —×— C (10^3 trofozoítos) —○— D (10^4 trofozoítos) —□— E (10^5 trofozoítos) —*— F (PBS). (***) $p < 0,001$.

4.3 *Determinação da Massa Corpórea:*

Infecção Primária

Após 42 dias da inoculação com trofozoítos de *G. duodenalis*, os animais foram novamente pesados, obtendo-se média de 61,0 g. Não se observou diferença estatisticamente significante entre as massas corpóreas pré e pós-inoculação ($p > 0,05$) (Figura 13 a).

Reinfecção

Os animais selecionados para a reinfecção possuíam aproximadamente 63,0 g. Após 42 dias, observou-se aumento na massa corpórea desses animais para 68,0 g, com diferença estatisticamente significativa em relação à massa pré-reinfecção ($p < 0,01$) (Figura 13 b).

Imunossupressão

Os animais que foram utilizados na imunossupressão pesavam aproximadamente 62,0 g. Após 42 dias, verificou-se redução na massa corpórea desses animais com média de 54,0 g. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre as massas corpóreas pré e pós-imunossupressão ($p < 0,001$) (Figura 13 c).

Reinfecção/Imunossupressão

Os animais selecionados para a reinfecção/imunossupressão pesavam aproximadamente 62,0 g e, após 42 dias, observou-se redução da massa corpórea desses animais para 55,0 g, com diferença estatisticamente significante ($p < 0,01$) (Figura 13 d).

Animais anteriormente infectados com diferentes doses de trofozoítos de *G. duodenalis* e que foram submetidos ao tratamento com o glicocorticóide Acetato de MetilPrednisolona (MPA) apresentaram emagrecimento e queda de pêlos até a quinta semana de tratamento. Após esse período, os animais foram recuperando gradativamente a massa corpórea e a pelagem.

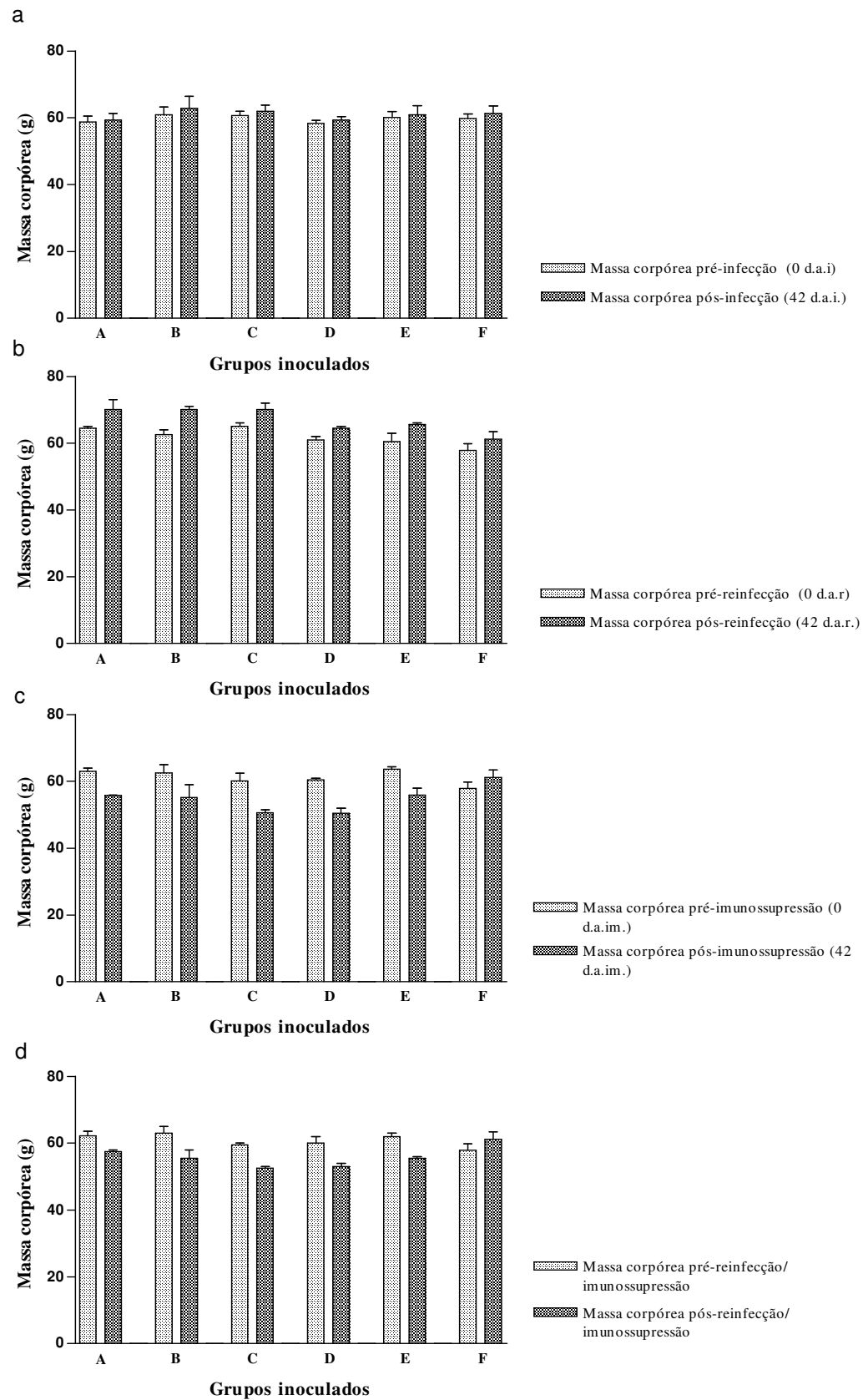


Figura 13. Massa corpórea dos animais durante (a) infecção primária em gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos (ATCC: 30888); (b) reinfecção; (c) imunossupressão; (d) reinfecção/imunossupressão. Os grupos e a proporção de inóculos estão representados como A (10^1 trofozoítos), B (10^2 trofozoítos), C (10^3 trofozoítos), D (10^4 trofozoítos), E (10^5 trofozoítos). Valores expressados em média $\pm$ erro padrão da média.

DISCUSSÃO

5. Discussão

A variação da resposta imunológica do hospedeiro é de fundamental importância para determinar o curso e a sintomatologia na infecção por *G. duodenalis*. Fatores ligados ao parasito como virulência, patogenicidade, número de cistos ingeridos e presença de infecções concomitantes e ao hospedeiro, como condição imunológica, idade e estado nutricional determinam, em conjunto, o curso clínico da infecção (BOREHAM, 1991).

A utilização de modelos experimentais no estudo da giardíase tem sido amplamente preconizada para investigar os mecanismos patológicos e imunes que ocorrem durante a infecção (CRAFT, 1982; HEWLETT, et al., 1982; YANKE, 1998). Dentre eles, os gerbils são considerados animais de escolha para avaliação do perfil clínico e patológico, por apresentar características patofisiológicas similares às encontradas em humanos (BELOSEVIC et al., 1983; BURET; GALL; OLSON, 1991; ARAÚJO et al., 2008). Acredita-se, portanto, que o padrão de resposta imune à *G. duodenalis* apresenta o mesmo perfil, podendo ser utilizado em estudos na infecção humana.

A utilização do trofozoíto, como inóculo, nesse estudo, corrobora com Argüello-Garcia e Ortega-Pierres (1997). Estes autores justificam que sua utilização é baseada na viabilidade e habilidade em colonizar o intestino do hospedeiro (CRAFT, 1982; HEWLETT et al., 1982). Gerbils apresentam susceptibilidade à infecção, independentemente da via de administração ou da forma infectante do parasito (BELOSEVIC et al., 1983; AGGARWAL; NASH, 1988).

Nesse estudo, o período pré-patente e a cinética da eliminação de cistos verificados na infecção primária de gerbils com trofozoítos de *G. duodenalis*, Portland-1, estão de acordo com outros autores, que utilizaram a mesma metodologia, observando período pré-patente entre 9 e 12 dias após infecção, com eliminação intermitente e irregular de cistos em até 40 d.a.i. (BELOSEVIC et al., 1983; AGGARWAL; NASH, 1987; ARAÚJO et al., 2008). Esses resultados, porém, foram diferentes dos observados por Buret; Gall; Olson (1991) que observaram eliminação dos primeiros cistos no 6º d.a.i., com pico de recuperação de trofozoítos nos dias 4 e 6 após a inoculação de 2×10^5 trofozoítos do isolado Portland-1. Esta diferença entre os dados apresentados por estes autores e os apresentados neste estudo, pode estar relacionada a fatores como idade, condição imunológica e estado nutricional do hospedeiro.

Várias proporções de trofozoítos foram inoculadas nos gerbils desse estudo, sendo observado que pequenas doses (10^1 e 10^2) foram suficientes para induzir eliminação de cistos. Essa observação corrobora com Rendtorff (1978) e Araújo et al. (2008) os quais demonstraram que pequenas doses de parasitos são suficientes para causar infecção em humanos e gerbils, respectivamente. Farthing (1997) relata que baixas doses de parasitos são suficientes para estabelecer infecção, devido à amplificação celular, onde cada excizoíto (16N) possui capacidade de originar quatro trofozoítos (4N) (BERNANDER; PALM; SVÄRD, 2001).

No presente estudo, verificou-se que os gerbils, em fase adulta, desenvolveram forte imunidade à reinfecção, não apresentando recrudescência, ou seja, nenhum animal eliminou cistos ou trofozoítos nas fezes. Esses resultados corroboram com Belosevic et al. (1983) que, após reinfetarem gerbils com 10^5 cistos de *G. duodenalis*, observaram que esses apresentaram resistência à infecção, demonstrado pela ausência de cistos nas fezes e trofozoítos no intestino delgado. De acordo com os autores, a imunidade adquirida em animais reinfetados, parece ser de longa duração, pois esses permaneceram protegidos à reinfecção por oito meses após a infecção primária. A imunidade protetora na reinfecção é sugerida pela natureza autolimitante na maioria das infecções, devido à frequente exposição aos antígenos do parasito, refletindo em baixa prevalência da giardíase, principalmente, em adultos residentes em áreas onde a doença é endêmica (BABB; PECK; VESCIA, 1971). Observa-se que indivíduos adultos, imunocompetentes e residentes nessas áreas, podem ser assintomáticos ou não eliminar cistos, contudo, o mesmo não ocorre em crianças (GRANOT et al., 1998). Skea e Underdown (1991) demonstraram que a resistência adquirida em camundongos, interfere no padrão de eliminação de cistos na reinfecção, os quais observaram redução de 90% no número de cistos eliminados, quando comparados à infecção primária, concluindo que o padrão de eliminação em processos de reinfecções é diferente de infecções primárias. Fatores como o genótipo do isolado, variação antigênica do parasito e fatores próprios do hospedeiro, também influenciam na manifestação da reinfecção (FAUBERT, 2000).

Com a supressão do sistema imune dos animais inoculados na infecção primária, independentemente da dose administrada, foi possível não somente verificar o retorno, mas o aumento da eliminação de cistos nas fezes, demonstrando que o parasito permaneceu no lúmen intestinal. Esses dados são similares aos obtidos por Lewis et al. (1987), que trataram gerbils, previamente infectados, com corticosteróides e observaram aumento no número de cistos liberados, comparados aos que não receberam o imunossupressor. Nair; Gillon;

Ferguson (1981) e Belosevic; Faubert; Maclean, (1986) utilizando cortisona e ciclosporina A, respectivamente, em camundongos com *G. muris*, observaram resultados similares, com aumento no número de cistos eliminados. Existem poucos trabalhos na literatura relacionados à giardíase em humanos imunocomprometidos. Estudos têm mostrado que a prevalência de cistos de *G. duodenalis* em fezes de pacientes hipogamaglobulinêmicos é significativamente maior que em indivíduos imunocompetentes (BROWN et al., 1972; LEDERMAN; WINKELSTEIN, 1985; FARTHING, 1989).

Os resultados obtidos após a reinfecção/imunossupressão foram similares aos resultados da imunossupressão, sendo 10 vezes maior o número de cistos eliminados quando comparados à infecção primária. Possivelmente, esse perfil tenha sido determinado apenas pela imunossupressão, uma vez que na reinfecção não se observou presença de cistos nas fezes. Não há na literatura estudos que abordem reinfecção/imunossupressão para comparação com os dados encontrados.

Nesse trabalho, foi demonstrado que a infecção experimental por *G. duodenalis* estimulou resposta imune humoral sistêmica e secretora intestinal específicas na infecção primária, reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão.

Na infecção primária, verificou-se que a detecção de IgA fecal ocorreu a partir do 7º d.a.i., corroborando com autores que relatam que a estimulação da resposta humoral nas Placas de Peyer ocorre nesse período (CRAIG; CEBRA, 1971; OWEN; ALLEN; STEVENS, 1981). Essa estimulação pode ser explicada pelo parasito residir no lúmen intestinal, sendo reconhecido rapidamente pelos linfócitos presentes na mucosa intestinal induzindo, portanto, a produção de IgA local mais rapidamente do que anticorpos sistêmicos (ECKMANN, 2003). Os grupos inoculados com maiores cargas parasitárias (10^4 e 10^5) apresentaram maior produção de IgA fecal, podendo-se conjecturar que a alta carga parasitária inoculada foi capaz de induzir resposta imune mais acentuada, com produção elevada de IgA secretora local, impedindo o processo de encistamento dos trofozoítos, com conseqüente redução na formação e eliminação de cistos (LEE; FAUBERT, 2006). Embora as doses de inóculo utilizadas nesse trabalho tenham influenciado a produção de IgA local, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de cistos eliminados entre os grupos. Possivelmente, indivíduos infectados com poucos cistos apresentem a mesma probabilidade em disseminar o parasito em relação àqueles infectados com altas doses. A produção de IgA fecal observada nesses animais foi diretamente proporcional à dose inoculada, enquanto a eliminação de cistos se mostrou inversamente proporcional à dose e aos níveis de IgA fecal.

Após a reinfecção, foram detectados níveis elevados de IgA fecal, em todos os grupos inoculados, quando comparados aos níveis detectados nos animais da infecção primária, no período correspondente. Portanto, sugere-se que a IgA fecal possa estar diretamente relacionada à resistência do hospedeiro a novas infecções. A eficiência e rapidez na produção desse anticorpo provêm da sensibilização ocorrida na infecção primária. Poucos trabalhos relatam sobre os níveis de IgA fecal na reinfecção. Velazquez et al. (2005) demonstraram que camundongos C3H/HeJ inoculados com 5×10^6 trofozoítos de *G. duodenalis* apresentaram níveis aumentados de anticorpos IgA fecal após a reinfecção.

Devido à imunossupressão, os animais não induziram resposta humoral secretora intestinal suficiente para controlar a infecção. Schechter e Feldman (1977) mencionam que altas doses de imunossupressor reduzem significativamente a concentração de imunoglobulinas. Após a aplicação do corticóide, observou-se, nesse estudo, forte redução nos níveis de IgA fecal. Entretanto, após o 28º dia de tratamento, provavelmente, a quantidade de glicocorticóide circulante esteja em declínio, favorecendo o retorno da síntese de IgA fecal.

Nos animais reinfetados/imunossuprimidos, observou-se que os níveis de IgA fecal foram modulados negativamente pela imunossupressão, uma vez que os animais apenas reinfetados, apresentaram aumento desse anticorpo entre a primeira e a segunda semana seguintes ao inóculo. Observou-se, também, que os níveis de IgA fecal detectados nesses animais voltaram a se elevar com intensidade menor que a observada naqueles somente imunossuprimidos. Essa diferença observada pode estar associada à virulência ou variação antigênica do isolado (NASH et al., 1988; NASH, 1992; FAUBERT, 2000). Estudos são necessários para demonstrar se diferentes genótipos induzem resposta imune diferente, levando à padrão de eliminação de cistos e sintomas diferentes (ROXSTRÖM – LINDQUIST et al., 2006).

Em relação à IgA sérica, observou-se que nos grupos infectados, os níveis desse anticorpo começaram a se elevar a partir da terceira semana após infecção, mais tardiamente que a IgA fecal. Embora a presença de IgA sérica reflita a estimulação da resposta imune sistêmica por *G. duodenalis*, seus níveis não são representativos durante a fase de eliminação do parasito. Esses resultados estão de acordo com autores, que relatam que a IgA sérica não possui papel atuante na defesa contra a giardíase (SNIDER; UNDERDOWN, 1986; DANIELS; BELOSEVIC, 1994). Apesar de IgA apresentar vida média relativamente curta, estudos demonstraram a persistência deste no soro, mesmo após o controle da infecção (ROBERTS-THOMSON; ANDERS, 1981). Goka et al. (1987) sugerem que a IgA anti-*Giardia* presente no soro seja útil indicador de exposição ao parasito.

Diferentemente da IgA fecal, apenas os grupos inoculados com as maiores doses de trofozoítos apresentaram níveis elevados de IgA sérica após a reinfecção. As menores doses de trofozoítos não foram capazes de estimular significativamente a produção desse anticorpo nesse período. Não existe na literatura dados relacionados aos níveis de IgA sérica após reinfecções em gerbils, contudo, nossos resultados sugerem que somente doses elevadas de inóculo são suficientes para estimular a produção desse anticorpo em novas exposições. Elevados níveis de IgA sérica têm sido relatados durante a fase de eliminação e após reinfecções em camundongos com *G. muris*, particularmente, em animais que são geneticamente resistentes à infecção (SNIDER; UNDERDOWN, 1986; HEYWORTH, 1986; HEYWORTH, 1992). Soliman et al. (1998) comentam que IgA sérica elevada podem representar a resposta do hospedeiro à exposição secundária ao parasito.

Os dados de IgA sérica observados na imunossupressão e reinfecção/imunossupressão demonstraram que o corticóide inibiu a produção desse anticorpo após sua aplicação, entretanto, foram detectados em níveis levemente elevados a partir da quarta semana, período em que a droga, provavelmente, não esteja atuando nas células relacionadas à produção desse anticorpo.

Os resultados obtidos na infecção primária mostraram forte resposta da IgG₁ sérica no período em que os animais não estavam mais eliminando cistos. Essa resposta sugere que os antígenos que melhor estimulam esta subclasse, estavam presentes em abundância nesse período e que estes antígenos estimularam células Th₂ (VISVESVARA et al., 1980; GILMAN; BROWN; VISVESVARA, 1985; JIMÉNEZ et al., 2004). Apesar dos níveis máximos de sua detecção serem observados após a interrupção da eliminação de cistos, esta imunoglobulina não participa diretamente do controle da infecção, pois se encontra sistemicamente, não agindo no parasito e/ou produtos no lúmen intestinal.

Os níveis elevados das subclasses de IgG após a reinfecção, podem representar resposta sistêmica de memória contra *G. duodenalis*. A presença de IgG anti-*Giardia* pode ser demonstrada em 80% de pacientes com giardíase sintomática (RIDLEY; RIDLEY, 1976; ROBERTS-THOMSON; ANDERS, 1981) e tende a ser mais elevada em indivíduos de áreas endêmicas, possivelmente, devido a repetidas exposições ao parasito (GOKA et al., 1986). Esses anticorpos persistem por meses ou anos no soro após a infecção primária e, portanto, são incapazes de distinguir entre infecções atuais e anteriores. (CERUZZI, 1974; GOKA et al., 1986).

Embora a *G. duodenalis* não invada o tecido epitelial, este parasito é capaz de alterar a arquitetura da mucosa intestinal com hiperplasia de criptas e atrofia das vilosidades (BURET

et al., 1992; HARDIN et al., 1997; ARAÚJO et al., 2008). Contudo, não se observam processos inflamatórios exacerbados nesta infecção, uma vez que não são produzidas quantidades significativas de citocinas pró-inflamatórias necessárias para estimular a produção de IgG_{2a} (DANIELS; BELOSEVIC, 1994). Neste contexto, observou-se, no presente estudo, expressão moderada de IgG_{2a} sérica, em todos os grupos infectados. Esses resultados demonstram que na infecção por *G. duodenalis* a participação do perfil Th₁, provavelmente, seja secundária. Essa observação foi relatada na infecção por *G. muris* em camundongos C57BL/6 por Daniels e Belosevic (1994) e por antígenos de excreção e secreção de *G. duodenalis* em camundongos BALB/c por Jiménez et al. (2004). Os níveis de IgG_{2a}, nos grupos inoculados com 10³, 10⁴ e 10⁵ trofozoítos, mantiveram-se elevados em relação aos grupos com 10¹ e 10² trofozoítos. Estudos anteriores demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados com *G. muris* não apresentaram níveis consideráveis de IgG₁ e IgG_{2a} séricos (DANIELS; BELOSEVIC, 1994).

Os níveis de IgG₁ e IgG_{2a} se mantiveram elevados e variáveis nos animais imunossuprimidos e reinfectados/imunossuprimidos, contrastando com os níveis detectados nos animais da infecção primária. Os dados obtidos levam a sugerir que os níveis elevados de tais isotipos no soro sejam decorrentes da estimulação anterior à imunossupressão ou reinfecção/imunossupressão e que, portanto, esses anticorpos não estejam relacionados à eliminação do parasito, pois se observa elevado número de cistos nas fezes nesse período.

Altos níveis de IgM sérica foram observados em todos os grupos infectados no início da infecção. Esses anticorpos são produzidos na fase inicial da giardíase e seus níveis declinam rapidamente em 2 a 3 semanas após a infecção primária (KAARS-SIJPESTEIJN; VONK, 1975). Os resultados obtidos nesse trabalho são similares aos encontrados por autores que utilizaram como modelo, ovelhas e camundongos infectados com *G. duodenalis* e *G. muris*, respectivamente, e sugeriram que antígenos do parasito são reconhecidos pelo hospedeiro no início da infecção (DANIELS; BELOSEVIC, 1994; YANKE et al., 1998). Nesse estudo, verificou-se que o período em que os níveis dessa imunoglobulina estavam mais elevados coincidiu com o período de maior eliminação de cistos. Isso demonstra que, provavelmente, a IgM sérica não participa ativamente no controle deste parasito, mas reflete a indução da resposta imune à infecção primária. Contudo, estudos têm demonstrado que a IgM, encontrada em mucosas, é capaz de controlar o número de parasitos *in vivo* (BUTSCHER; FAUBERT, 1988).

Após nova exposição ao parasito, observou-se que apenas os animais do grupo inoculado com 10⁵ trofozoítos foram capazes de induzir a produção de IgM sérica. Dessa

forma, sugere-se que apenas quantidades excessivas do parasito estimulem a produção desse anticorpo nas reinfecções, pois os grupos inoculados com doses inferiores, não conseguiram estimular sua produção. Granot et al. (1998) demonstraram que em populações residentes em área endêmicas, onde reinfecções são freqüentes, o padrão de anticorpos IgM específicos é baixo e uniforme, sendo possível, ser utilizada para diferenciação entre infecção atual e passada por *G. duodenalis*. Embora tenha se verificado que, apenas, o grupo inoculado com 10^5 trofozoítos foi capaz de induzir a produção de IgM na reinfecção, observou-se, nesse estudo, que na imunossupressão e reinfecção/imunossupressão, nenhum dos inóculos foi capaz de estimular a produção desse anticorpo.

No presente estudo, não foi observada produção de IgE específica à *G. duodenalis* na infecção primária, reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão, pois ao contrário das infecções por helmintos intestinais que apresentam o fenômeno da hipersensibilidade imediata, observa-se que em infecções por protozoários este fenômeno é incomum (FARTHING, 1996). Entretanto, a *G. duodenalis* pode originar processo de hipersensibilidade imediata no local do parasitismo, promovendo a eosinofilia, bem como aumento na produção de IgE total (MELO-REIS et al., 2007). Farthing et al. (1984) reportam que há aumento na concentração sérica de IgE total, embora não haja aumento nos níveis de IgE anti-*Giardia*, sugerindo que a infecção possa aumentar a permeabilidade intestinal, permitindo a entrada de antígenos alimentares, que têm como alvo a resposta de IgE, sendo responsáveis pela resposta de hipersensibilidade durante a infecção. Jiménez et al. (2004) demonstraram que antígenos excretados e secretados pelo parasito apresentam moléculas similares a alérgenos, capazes de estimular a produção de IgE total e específica ao parasito.

A perda de peso em indivíduos acometidos por giardíase é uma consequência importante e citada por vários autores. De acordo com Ravich e Bayless (1983) ao estudarem a sintomatologia da giardíase, relataram que quando o parasito se instala na mucosa intestinal, pode provocar a destruição das criptas intestinais, o que leva ao comprometimento da capacidade de ação das enzimas sobre os seus substratos específicos, já que estas se localizam na região mencionada. Assim, os carboidratos se acumulam no lúmen intestinal, induzindo o aumento peristáltico e a perda destes, pela diarreia. Esta perda significativa dos carboidratos pode explicar a progressiva perda de peso que ocorre durante a doença. Neste estudo, porém, não foram verificada perda de peso nos animais infectados e reinfetados. Ao contrário, ao longo do período experimental os animais obtiveram ganho significativo de peso. Estes achados são semelhantes com os de Belosevic et al. (1989), que utilizaram uma dose de inóculo de 2×10^5 trofozoítos. Para explicação de tal fato, seria necessário um estudo

histopatológico da mucosa intestinal dos animais experimentais, com o intuito de se observar se ocorreu ou não lesão das criptas do intestino, na tentativa de se justificar, a ausência da perda do peso. Em contrapartida, os animais que foram imunossuprimidos apresentaram acentuada perda de peso em decorrência da administração do corticóide, possivelmente, devido às lesões mais acentuadas na mucosa intestinal.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- Gerbils inoculados com diferentes doses de trofozoítos de *G. duodenalis* mostraram-se susceptíveis à infecção primária.
- O período pré-patente observado foi entre 9 e 13 dias nos grupos inoculados.
- A eliminação de cistos manteve-se intermitente e em quantidade variável entre o 21º e 27º d.a.i. nos grupos inoculados.
- Não foi observada recrudescência da infecção em animais reinfectedos.
- Os gerbils da infecção primária submetidos à imunossupressão e reinfectedos e imunossuprimidos apresentaram recrudescência da infecção.
- A infecção primária, reinfecção, imunossupressão e reinfecção/imunossupressão induziram resposta imune humoral sistêmica e secretora intestinal.
- Na reinfecção foi observada rápida produção de anticorpos séricos e secretores.
- A IgA fecal pode ser importante no controle da infecção.
- Os anticorpos séricos específicos, possivelmente, não atuam na eliminação do parasito apesar de estimular resposta imune.
- Animais imunossuprimidos apresentaram menor produção dos anticorpos responsáveis pelo controle da infecção.
- Na reinfecção/imunossupressão observou-se que a ação do agente imunossupressor foi mais eficiente na inibição da resposta imune, do que o parasito no estímulo dessa resposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

ABDUL-WAHID, A.; FAUBERT, G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 691-703, 2008.

ADAM, R.D. The biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 447-475, 2001.

ALI, S.A.; HILL, D.R. *Giardia intestinalis*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 453-460, 2003.

ANDREWS, R.H.; ADAMS, M.; BOREHAM, P.F.L.; MAYRHOFER, G. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 19, p. 183-190, 1989.

AGGARWAL, A.; NASH, T.E. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, p. 325-332, 1987.

AGGARWAL, A.; NASH, T.E. Antigenic variation of *Giardia lamblia* *in vivo*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 561, n. 4, p. 1420-1423, 1988.

AMENT, M.E.; RUBIN, C.E. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. **Gastroenterology**, New York, v. 62, p. 216-226, 1972.

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

ARGÜELLO-GARCIA, R.; ORTEGA-PIERRES, M.G. *Giardia duodenalis*: Analysis of humoral immune response in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Archives of Medical Research**, México, v. 28, n. 2, p. 171-178, 1997.

BABB, R.R.; PECK, O.C.; VESCIA, F.G. Giardiasis: a cause of travelers diarrhoea. **Journal of the American Medical Association**, Lakewood, v. 217, p. 1359-1361, 1971.

BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G.M.; DHARAMPAUL, S. Antimicrobial action of antibodies against *Giardia muris* trophozoites. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 95, p. 485-489, 1994.

BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G.M.; MacLEAN, J.D. The effects of cyclosporine A on the course of infection with *Giardia muris* in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 35, p. 496-500, 1986.

BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G.M.; MacLEAN, J.D. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. **Gut**, London, v. 30, p. 1213-1219, 1989.

BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G.M.; MacLEAN, J.D.; LAW, C. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 222-226, 1983.

BERNANDER, R.; PALM, J.E.D.; SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cellular Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 55-62, 2001.

BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharmaceutical Journal**, Washington, v. 234, p. 271-274, 1991.

BROWN, W.R.; BUTTERFIELD, D.; SAVAGE, D.; TADA, T. Clinical, microbiological and immunological studies in patients with immunoglobulin deficiencies and gastrointestinal disorders. **Gut**, London, v. 13, p. 441-449, 1972.

BURET, A.; GALL, D.G.; NATION, P.N.; OLSON, M.E. Intestinal protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 6, n. 12, p. 375-380, 1991.

BURET, A.; GALL, D.G.; OLSON, M.E. Growth, activities of enzymes in the small intestines and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 77, p. 109-114, 1991.

BURET, A.G.; HARDIN, J.A.; OLSON, M.E.; GALL, G. Pathophysiology of the small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Gastroenterology**, New York, v. 125, p. 11-19, 1992.

BURET, A.G.; MITCHELL, K.; MUENCH, D.G.; SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupt tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, London, v. 125, p. 11-19, 2002.

BUTSCHER, W.G.; FAUBERT, G.M. The therapeutic action of monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Giardia muris*. **Immunology**, v. 64, p. 175-180, 1988.

CARLSON, J.R.; HEYWORTH, M.F.; OWEN, R.L. T-lymphocytes subsets in nude mice with *Giardia muris* infection. **Thymus**, Dordrecht, v. 9, p. 189-196, 1987.

CERUZZI, F. Accion del dietilditiocarbamato de sódio sobre *Bacillus subtilis* y otros microorganismos. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Córdoba**, Córdoba, v. 32, p. 313-319, 1974.

COBEA. Princípios Éticos na Experimentação Animal. Available in www.cobea.org.br. Accessed in: 04/04/2008.

COSTA, C.A.; SANTOS, M.V.; ROCHA, M.O.; MELLO, R.T.; BODAN, M.M.B. Parasitoses intestinais em crianças da creche Leonor Franco (SESIMINAS- Contagem, MG): Diagnóstico e terapêutica. **Revista de Farmácia e Bioquímica da UFMG**, Belo Horizonte, v. 9, p. 7-13, 1988.

CRAFT, J.C. Experimental infection with *Giardia lamblia* in rats. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 145, n. 4, p. 495-498, 1982.

CRAFT, J.C.; NELSON, J.D. Diagnosis of giardiasis by counterimmunoelectrophoresis of feces. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 145, p. 499-504, 1982.

CRAIG, S.W.; CEBRA, J.J. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 134, p. 188-193, 1971.

CURY, G.C.; SALLES, P.C.O.; REIS, M.C.W.; REGO, V.M.; ARNDT, A.W.; SOUZA FILHO, C.B.A.; MOREIRA, H.B.; ABREU, M.S.; LEITE, P.M.G. Prevalência da Esquistossomose e de parasitoses intestinais em escolares da área rural do Município de Jaboticatubas, MG, 1992-1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 217-220, 1994.

DANIELS, C.W.; BELOSEVIC, M. Serum antibody responses by male and female C57BL/6 mice infected with *Giardia muris*. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 97, p. 424-429, 1994.

DIAMOND, L.S.; HARLOW, D.P.; CUNNICK, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 72, n. 4, p. 431-432, 1978.

DJAMIATUN, K.; FAUBERT, G.M. Exogenous cytokines released by spleen and Peyer's patch cells removed from mice infected with *Giardia muris*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 20, p. 27-36, 1998.

ECKMAM, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 25, p. 259-270, 2003.

ECKMANN, L.; LAURENT, F.; LANGFORD, T.D.; HETSKO, M.L.; SMITH, J.R.; KAGNOFF, M.F.; GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-

dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 1478-1487, 2000.

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J.; PAWLEY, J. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 73, p. 623-629, 1987.

ERLANDSEN, S.L.; BEMRICK, W.J.; WELLS, C.L.; FEELY, D.E.; KNUDSEN, L.; CAMPBELL, S.R.; van KEULEN, H.; JARROLL, E.L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 76, n. 5, p. 717-724, 1990.

ERLICH, J.H.; ANDERS, R.F.; ROBERTS-THOMSON, L.C.; SCHRODER, J.W.; MITCHELL, G.F. An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity reactions as contributing factors to chronic infection with the intestinal protozoan parasite, *Giardia muris*, in mice. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 61, p. 599-615, 1983.

FARTHING, M.J.G. Giardiasis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 493-515, 1996.

FARTHING, M.J.G. Host parasite interactions in human giardiasis. **Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 70, p. 191-204, 1989.

FARTHING, M.J.G. The molecular pathogenesis of giardiasis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, USA, v. 24, p. 79-88, 1997.

FARTHING, M.J.G.; CHONG, S.; WALKER-SMITH, J.A. Acute allergic phenomena in giardiasis. **Lancet**, London, v. 2, p. 1428, 1984.

FAUBERT, G. Immune Response to *Giardia duodenalis*. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 13, n. 1, p. 35-54, 2000.

FAUBERT, G.M.; BELOSEVIC, M.; WALKER, T.S.; MacLEAN, D.C.; MEEROVITCH, E. Comparative studies on the pattern of infection with *Giardia* spp. in Mongolian gerbils. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 69, n. 5, p. 802-805, 1983.

FAUST, E.C; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoan and helminths in feces. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 25, p. 241-262, 1938.

FEDORKO, D.P.; WILLIAMS, E.C.; NELSON, N.A.; CALHOUN, L.B.; YAN, S.S. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2781-2783, 2000.

FILICE, F.P. Studies on the citology and the life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **University of California Publications in Zoology**, California, v. 57, p. 53-143, 1952.

GEERTS, S.; KUMAR, V.; BRANDT, J.R. A preliminary report on *Meriones unguiculatus* as an experimental host for *Taenia saginata* metacestodes. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 301-304, 1982.

GILMAN, R.H.; BROWN, K.H.; VISVESVARA, G.S.; MONDAL, G.; GREENBERG, B.; SACK, R.B.; BRANDT, F.; KHAN, M.U. Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 469-473, 1985.

GOKA, A.K.; ROLSTON, D.D.K.; MATHAN, V.I.; FARTHING, M.J.G. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. **Lancet**, London, v. 2, p. 184-186, 1986.

GOKA, A.K.; ROLSTON, D.D.K.; MATHAN, V.I.; FARTHING, M.J.G. Human serum IgA response to *Giardia lamblia*. **Gut**, London, v. 28, p. 1351, 1987.

GOLDIN A.J.; WERNER, A.P.T.; AGUILERA, X.; ZULANTAY, I.; WARHURST, D.C.; MILLES, M.A. Efficient diagnosis of giardiasis among nursery and primary school children

in Santiago by capture ELISA for detection of fecal *Giardia* antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 538-548, 1990.

GRANOT, E.; SPIRA, D.T.; FRASER, D.; DECKELBAUM, R.J. Immunologic response to infection with *Giardia lamblia* in children: effect of different clinical settings. **Journal of Tropical Pediatrics**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 241-246, 1998.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M.L.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 501-506, 1995.

HALL, A. *Giardia* infections: epidemiology and nutritional consequences. In: THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDS, J.A.; LYMBERY, A.J. (Ed). ***Giardia: from molecules to disease***, Cambridge: CAB International, Cap.17, p. 251-280, 1994.

HARDIN, J.A.; BURET, A.G.; OLSON, M.E.; KIMM, M.H.; GALL, D.G. Mast cell hyperplasia and increase macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 83, p. 908-912, 1997.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation –Protozoa: *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Water Quality and Health Bureau, Health Environments and Consumer Safety Branch**, Health Canada, Ottawa, 2004.

HEGNER, R.W. A comparative study of the *Giardia* living in man, rabbit and dog. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 2, p. 442-454, 1922. apud THOMPSON, R.C.A.; LYMBERY, A.J.; MELONI, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1982: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Farnham Royal, v. 14, p. 1-28, 1990.

HERMANS, P.E.; DIAZ-BUXO, J.A.; STOBO, J.D. Idiopathic late onset immunoglobulin deficiency. **The American Journal of Medicine**, USA, v. 61, p. 221-237, 1976.

HEWLETT, E.L.; ANDREWS, J.S.Jr.; RUFFIER, J.; SCHAEFER III, F.W. Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 145, n. 1, p. 89-93, 1982.

HEYWORTH, M.F. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 78, n. 1, p. 73-76, 1992.

HEYWORTH, M.F. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 199, p. 465-472, 1992.

HEYWORTH, M.F. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. **Infection and Immunity**, Washington, v. 52, p. 568-571, 1986.

HEYWORTH, M.F.; CARLSON, J.R.; ERMAL, T.H. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 165, p. 1743-1748, 1987.

HILL, D.R. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. **Infectious Diseases Clinics of North America**, USA, v. 7, n. 3, p. 503-525, 1993.

HILL, D.R.; GUERRANT, R.L.; PEARSON, R.D.; HEWLETT, E.L. *Giardia lamblia* infection of suckling mice. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 147, n. 2, p. 217-221, 1983.

HOPKINS, R.N.; MELONI, B.P.; GROTH, D.M.; REYNOLDSON, J.A; THOMPSON, R.C.A. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 83, n. 1, p. 44-51, 1997.

HOQUE, M.E.; HOPE, V.T.; KJELLSTROM, T.; SCRAGG, R.; LAY-YEE, R. Risk of giardiasis in Aucklanders: a case control study. **The International Journal of Infectious Diseases**, v. 6, p. 191, 2002.

HUGHES, W.S.; CEDRA, J.J.; HOLFEZAPPLE, P.; BROOKS, F.P. Primary hypogammaglobulinemia and malabsorption. **Annals of Internal Medicine**, USA, v. 74, p. 89-91, 1971.

JAKUBOWSKI, W.; GRAUN, G.F. Update on the control of *Giardia* in water supplies. In: OLSON, B. E.; OLSON, M. E.; WALLIS, P. M. (Eds.), *Giardia: The Cosmopolitan Parasite*. **CAB International**, p. 217-238, 2002.

JIMÉNEZ, J.C.; FONTAINE, J.; GRZYCH, J.M.; DEI-CAS, E.; CAPRON, M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 152-160, 2004.

KAARS-SIJPESTEIJN, A.; VONK, J.W. Decomposition of bisditiocarbamates and metabolism by plants and microorganisms. **Environmental quality and safety**, supplement, Germany, v. 3, p. 57-61, 1975.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 77, p. 487-488, 1983.

KENNEDY, J.P. Giardiasis-zoonosis or not? **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Lakewood, v. 194, n. 4, p. 447-450, 1989.

KIRKPATRICK, C.E.; GREEN IV, G.A. Susceptibility of domestic cats to infections with *Giardia lamblia* cysts and trophozoites from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 21, p. 678-680, 1985.

KOUNTZ, D.S.; CLARK, C.L. Safely withdrawing patients from chronic glucocorticoid therapy. **American Family Physician**, USA, v. 55, n. 2, p. 521-525, 1997.

KULDA, J.; NOHYNKOVA, E. Flagellates of human intestine and of other species. In: KREIER, J. P. (Ed.), **Parasitic Protozoa**, v. 2, p. 225- 422, 1996.

LANE, S.; LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 123-147, 2002.

LANGFORD, T.D.; HOUSLEY, M.P.; BOES, M.; CHEN, J.; KAGNOFF, M.F.; GILLIN, F.D.; ECKMANN, L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 11-18, 2002.

LEDERMAN, H.M.; WINKELSTEIN, J.A. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. **Medicine**, Baltimore, v. 64, p. 145-156, 1985.

LEE, P.; FAUBERT, G.M. Oral immunization of BALB/c mice by intragastric delivery of *Streptococcus gordonii*-expressing *Giardia* cyst wall protein 2 decreases cyst shedding in challenged mice. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 265, p. 225-236, 2006.

LEWIS, P.D.; BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G.M.; CURTHOYS, L.; MacLEAN, J.D. Cortisone-induced recrudescence of *Giardia lamblia* infections in gerbils. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, p. 33-40, 1987.

LI, E.; ZHOU, P.; PETRIN, Z.; SINGER, S.M. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 6642-6649, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGHT, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUJAN, H.D.; MOWATT, M.R.; NASH, T.E. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 14, n. 11, p. 446-450, 1998.

MAYRHOFER, G.; ANDREWS, R.H.; EY, P.L.; CHILTON, N.B. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblage by eletrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. **Parasitology**, London, v. 111, p. 11-17, 1995.

MELO-REIS, P.R.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; DIAS-PENNA, K.G.B.; COSTA, S.H.N.; MESQUITA, M.M.; SILVA, J.B.; CASTRO, F.S.; CHEN, L.C. Correlation between

eosinophilia and parasitic infections for *Giardia lamblia* in children. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 237-239, 2007.

MELONI, B.P.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive, biology, population structure, taxonomy and epidemiology. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v. 81, n. 3, p. 368-383, 1995.

MEYER, E.A. Introductions, p. 1-9. In A. E. Meyer (ed), **Giardiasis** 1990. Elsevier Publishing Co., New York, N.Y., 1990.

MILLER, T.A.; SCHAEFER III, F.W. Characterization of a single dose methylprednisolone acetate immune suppression model using *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 66-83, 2006.

MILLER, T.A.; SCHAEFER III, F.W. Methylprednisolone acetate immune suppression produces differing effects on *Cryptosporidium muris* oocyst production depending on when administered. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, p. 77-84, 2007.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; MAYRHOFER, G.; EY, P.L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 29-38, 2003.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C.A. *Cryptosporidium* and *Giardia* – Zoonoses: fact or fiction? **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, p. 233-244, 2003.

MOORE, G.T.; CROSS, W.M.; MCGUIRE, D.; MOLLOHAN, C.S.; GLEASON, N.N.; HEALY, G.R.; NEWTON, L.H. Epidemic giardiasis at a ski resort. **The New England Journal of Medicine**, v. 281, p. 402-407, 1969.

MÜLLER, N.; von ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, p. 1339-1347, 2005.

MUNDIM, M.J.S.; SOUZA, S.Z.; HORTÊNCIO, S.M.; CURY, M.C. Frequência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 770-773, 2003.

NAIR, K.V.; GILLON, J.; FERGUSON, A. Corticosteroid treatment increases parasite numbers in murine giardiasis. **Gut**, London, v. 22, p. 475-480, 1981.

NASH, T.E. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 8, n.7, p. 229-235, 1992.

NASH, T.E.; AGGARWAL, A. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 136, p. 2628-2632, 1986.

NASH, T.E.; AGGARWAL, A.; ADAM, R.D.; CONRAD, J.T.; MERRITT Jr., J.W. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 141, p. 636-641, 1988.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W. *Giardia* vaccination. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, p. 213-217, 2000.

ORTEGA, Y.R.; ADAM, R.D. *Giardia* overview and update. **Journal of Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 545-550, 1997.

OWEN, R.L.; ALLEN, C.L.; STEVENS, D.P. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 32, p. 591-601, 1981.

RAVICH, W.J.; BAYLESS, T.M. The carbohydrate absorption. *Clinical of Gastroenterology*, v. 12, p. 335-356, 1983.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. In W. Jacobowski and J. C. Hoff, ed. **Waterborne transmission of giardiasis**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C; p. 64-81, 1978.

RIDLEY, M.J.; RIDLEY, D.S. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 29, p. 30-34, 1976.

ROBERTS-THOMSON, I.C.; ANDERS, R.F. Granulomatous hepatitis and cholangitis associated with giardiasis. **Gastroenterology**, New York, v. 80, p. 1262.

ROBERTS-THOMSON, I.C.; STEVENS, D.P.; MAHMOUD, A.A; WARREN, K.S. Giardiasis in the mouse: an animal model. **Gastroenterology**, New York, v. 71, p. 57-61, 1976.

ROCHA, M.O.; MELLO, R.T.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; TOLEDO, V.P.C.P.; MOREIRA, M.C.C.G.; COSTA, C.A. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay, in Belo Horizonte, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 151-154, 1999.

ROXSTRÖM-LINDQUIST, K.; PALM, D.; REINER, D.; RINGQVIST, E.; SVÄRD, S.G. *Giardia* immunity-an update. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, n. 1, p. 26-31, 2006.

SCHECHTER, B.; FELDMAN, M. Hydrocortisone affects tumor growth by eliminating precursors of suppressor cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 119, v. 5, p. 1563-1568, 1977.

SCHLEINITZ, P.; JUSTUS, P.; STENZEL, P.; OWEN, R.; MEYER, E. A. Successful introduction of culture adapted *Giardia intestinalis* in a rabbit model: ultrastructural features. **Gastroenterology**, New York, v. 84, p. 1301, 1983.

SCOTT, K.G.E.; MEDDINGS, J.B.; KIRK, D.R.; LEES-MILLER, S.P.; BURET, A.G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. **Gastroenterology**, New York, v. 123, p. 1179-1190, 2002.

SEGHALL, A.K.; GREWAL, M.S.; CHACRAVARTI, R.R.; BROOR, S.L.; DEKA, N.C.; CHHUTTANI, P.N. Experimental giardiasis in albino rats. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 64, n. 7, p. 1015-1018, 1976.

SINGER, S.M.; NASH, T.E. T-Cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 8, n. 1, p. 170-175, 2000.

SKEA, D.L.; UNDERDOWN, B.J. Acquired resistance to *Giardia muris* in X-linked immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, p. 1733-1738, 1991.

SMITH, P.D.; KEISTER, D.B.; ELSON, C.O. Human host response to *Giardia lamblia*. II. Antibody-dependent killing *in vitro*. **Cellular Immunology**, USA, v. 82, p. 308-315, 1983.

SNIDER, D.P.; SKEA, D.; UNDERDOWN, B.J. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the *xid* gene. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 11, p. 2338-2342, 1988.

SNIDER, D.P.; UNDERDOWN, B.J. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 52, p. 271-278, 1986.

SOLIMAN, M.M.; TAGHI-KILANI, R.; ABOU-SHADY, A.F.; EL-MAGEID, S.A.A.; HANDOUSA, A.A.; HEGAZI, M.M.; BELOSEVIC, M. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 232-239, 1998.

STEVENS, D.P.; FRANK, D.M.; MAHMOUD, A.A.F. Thymus dependency of host resistance to *Giardia muris* infection: studies in nude mice. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 120, p. 680-682, 1978.

STIBBS, H.H.; SAMADPOUR, M.; ONGERTH, J.E. Identification of *Giardia lamblia* – specific antigens in infected human and gerbil feces by Western Immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 10, p. 2340-2346, 1990.

THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1259-1267, 2000.

THOMPSON, R.C.A. Towards a better understanding of host specificity and transmission of *Giardia*: The impact of molecular epidemiology. In: OLSON, B.E.; OLSON, M.E.; WALLIS, P.M. (Eds.), *Giardia*: The Cosmopolitan Parasite. **CAB International**, p. 55- 69, 2002.

THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, London, v. 58, p. 69-137, 2004.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 211-213, 2000.

THOMPSON, R.C.A.; LYMBERY, A.J.; MELONI, B.P. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1982: taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Farnham Royal, v. 14, p. 1-28, 1990.

THOMPSON, R.C.A.; REYNOLDSON, J.A.; MENDIS, A.H.W. *Giardia* and giardiasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 32, p. 71- 160, 1993.

TORRES, D.A.G.V.; CHIEFFI, P.P.; COSTA, W.A.; KUDZIELICS, E. Giardíase em creches mantidas pela Prefeitura do município de São Paulo, 1982/1983. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 137-142, 1991.

UNGAR, B.L.P.; YOLKEN, R.H.; NASH, T.E.; QUINN, T.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 149, p. 90-97, 1984.

VELAZQUEZ, C.; BELTRAN, M.; ONTIVEROS, N.; RASCON, L.; FIGUEROA, D.C.; GRANADOS, A.J.; HERNANDEZ-MARTINEZ, J.; HERNANDEZ, J.; ASTIAZARAN-GARCIA, H. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 27, p. 351-356, 2005.

VENKATESAN, P.; FINCH, R.G.; WAKELIN, D. Comparison of antibody and cytokine responses to primary *Giardia muris* infection in H-2 congenic strains of mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, p. 4525-4533, 1996.

VENKATESAN, P.; FINCH, R.G.; WAKELIN, D. A comparison of mucosal inflammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 19, p. 137-143, 1997.

VIDAL, A.M.; CATAPANI, W.R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 123, n. 6, p. 282-285, 2005.

VINAYAK, V.K.; SHARMA, G.L.; NAIK, S.R. Experimental *Giardia lamblia* infection in Swiss mice — a preliminary report. **Indian Journal Medicine Research**, New Delhi, v. 70, p. 195-198, 1979.

VISVESVARA, G.S.; SMITH, P.D.; HEALY, G.R.; BROWN, W.R. An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia*. **Annals of Internal Medicine**, USA, v. 93, p. 802-805, 1980.

WRIGHT, R.A.; SPENCER, H.C.; BRODSKY, R.E; VERNON, T.M. Giardiasis in Colorado: an epidemiologic study. **American Journal of Epidemiology**, USA, v. 105, p. 330-336, 1977.

YANKE, S.J.; CERI, H.; MCALLISTER, T.A.; MORCK, D.W.; OLSON, M.E. Serum immune response to *Giardia duodenalis* in infected lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 75, p. 9-19, 1998.

ZAJAC, A.M. Giardiasis. **Comp Cont Educ Prac Vet**, Toronto, v. 14, n. 5, p. 604-610, 1992.

ZAJAC, A.M.; JOHNSON, J.; KING, S.E. Evaluation of the importance of centrifugation as a component zinc sulfate fecal flotation examination. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 38, p. 221-224, 2002.

ZIAM, H.; PANDEY, V.S.; DARWICHE, J.; LOSSON, B.; KUMAR, V. Biological parameters of *Trichostrongylus colubriformis* in *Meriones unguiculatus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 81, n. 4, p. 309-322, 1999.

ZOOROB, R.J.; CENDER, D. A different look at corticosteroids. **American Family Physician**, USA, v. 58, n. 2, p. 443-450, 1998.