

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Avaliação da influência de diferentes inóculos do isolado humano (Portland -I) de *Giardia duodenalis* sobre a cinética da infecção e no desenvolvimento de alterações patológicas no intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte de obtenção do título de mestre.

Núbia da Silva Araújo

Uberlândia- MG

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Avaliação da influência de diferentes inóculos do isolado humano (Portland -I) de *Giardia duodenalis* sobre a cinética da infecção e no desenvolvimento de alterações patológicas no intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte de obtenção do título de mestre.

Núbia da Silva Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Cury

Uberlândia- MG

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

Avaliação da influência de diferentes inóculos do isolado humano (Portland -I) de *Giardia duodenalis* sobre a cinética da infecção e no desenvolvimento de alterações patológicas no intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentalmente infectados

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte de obtenção do título de mestre.

Banca Examinadora:
Uberlândia, 17 de Fevereiro de 2006.

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares

Prof. Dr. Marcos Silva

Profa. Dra. Márcia Cristina Cury

Uberlândia-2006

*Essa dissertação é dedicada à memória de meu pai, **RAIMUNDO TERCEIRO R. ARAÚJO**, herói de todas as horas que em muito se sacrificou para que hoje eu pudesse estar aqui.*

*À minha mãe, **Cida**, e meu irmão, **Leonardo**, e ao meu “amor” **Tiago**, pela paciência que tiveram comigo durante os últimos 24 meses e pelo porto seguro que sempre foram para mim.*

Tocando em frente

Almir Sater e Renato Teixeira

*Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei*

*Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso o amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir.*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha, e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
De estrada eu sou*

*Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz, e ser feliz.*

*Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz, e ser feliz.*

Agradecimentos...

À **Deus,**

Por permitir, que mesmo diante de todas as dificuldades enfrentadas conseguisse vencer mais uma etapa da minha vida. A Ti Senhor toda a Honra e toda a Glória !!!.

À minha **Mãe,**

Em especial à você minha mãe que mesmo diante de todos os problemas e da ausência de meu pai, não mediu esforços para que fosse possível a continuidade do caminho traçado, sempre procurando novas alternativas para os problemas que pareciam já sem solução, ignorando inúmeras vezes meus deslizes.

Ao meu irmão **Leonardo,**

Pela compreensão, paciência e força nos momentos de dificuldade além das brincadeiras e senso de humor inigualável que muitas vezes fizeram com que eu sorrisse diante das dificuldades.

Ao **Tiago,**

More, nem preciso falar a sua importância na realização desta dissertação, obrigada pelas horas que você me escutou, pelas vezes que abdicando de seu descanso me ajudou a cuidar dos meus ratinhos, pelas horas passadas dentro do carro em Ribeirão Preto, por tudo... Obrigada, **Te Amo muito....**

À Profa. **Maria José Mundim,**

Pelo auxílio desde a elaboração do projeto até a conclusão desta dissertação, Obrigada!

Ao professor **Marcos Rossi,**

Por me receber tão bem em seu laboratório e não medir esforços para que meu trabalho fosse bem sucedido.

Aos técnicos **Elaine e José Martins (UFU), Mônica e Lúcia (FMRP) e João Vianna (UFMG),**

Obrigado pelo apoio, paciência, e cooperação. Com certeza, sem vocês não seria possível a realização desta dissertação.

Aos secretários **Jorge, Lucineide e Neto,**

Obrigada pela atenção e disposição com as quais sempre me atenderam.

Aos **amigos da turma de mestrado 2004-2006,**

Obrigada pela companhia e pelos momentos de descontração.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho,

Muito Obrigada!!!

Agradecimento Especial

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas,

Ensinar é com certeza um dom, trabalhar com turmas de pós-graduação, acredito que exija mais ainda de cada profissional. Obrigado pelas horas de debate, leitura, preparação de seminários e etc., com certeza contribuíram para minha formação tanto intelectual quanto moral.

À minha orientadora, Márcia Cristina Cury,

Marcinha, acho que nestes cinco anos de trabalho desenvolvemos muito mais que um sentimento de amizade, acho que fraternidade seria mais próximo daquilo que sinto por você. Obrigada pelo carinho, compreensão, dinamismo, puxões de orelha (no bom sentido!), pelo ombro amigo nas horas difíceis e pela cara de pau que muitas vezes tivemos que nos valer para que fosse possível a realização desta dissertação. Valeu amiga, vou levar pra sempre comigo seus ensinamentos e seu carinho.

RESUMO

Giardia duodenalis é, hoje, considerada grave problema de saúde pública acometendo indivíduos, independente de características culturais ou sócio-econômicas. Para comparar a cinética da infecção e alterações patológicas no intestino delgado, produzidas por *Giardia duodenalis*, 72 gerbils, foram divididos em 6 grupos (A ao F), sendo A o controle e os demais inoculados com doses de 10, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵ trofozoítos do isolado Portland-1. Para o acompanhamento da cinética da infecção foram realizados exames coprológicos, diariamente, até o 35º dia após a inoculação. Uma vez detectados nas fezes, os cistos foram separados por flutuação em gradiente de sacarose e contados em câmara de Newbauer. Para o acompanhamento do desenvolvimento de alterações histopatológicas, 3 animais de cada grupo foram sacrificados nos dias 5, 17, 23 e 35 após a inoculação. Posteriormente, foram retiradas 3 porções do intestino delgado superior. Estas foram processadas para a contagem do número de trofozoítos aderidos à mucosa, para a análise histopatológica em HE e para microscopia eletrônica de varredura. Observou-se período pré-patente de 12 dias, com eliminação intermitente até o 35º dia após inoculação. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre o número médio de trofozoítos recuperados, por grupo, nos dias de sacrifício e correlação positiva entre dose de inóculo e o número de trofozoítos recuperados. Morfometricamente observou-se queda no valor da razão vílon/crípta em todos os grupos, quando comparados ao grupo controle, sendo observada atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou, aumento na produção de muco nos animais inoculados e presença de nichos de trofozoítos no topo e base dos vílons. Este estudo demonstrou que, a dose do inóculo de trofozoítos não interfere na capacidade de ocorrer infecção, nem no desenvolvimento de alterações histopatológicas geradas pela colonização do intestino por trofozoítos.

Palavras-chaves: *Giardia duodenalis*, trofozoitos, *Meriones unguiculatus*, histopatologia.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is, today, considered serious problem of public health attacking individuals, independent of characteristics cultural or socioeconomic. To compare the kinetics of the infection and pathological alterations in the small intestine, produced by *Giardia duodenalis*, 72 gerbils, were divided in 6 groups (A to F), being A the control and the others inoculated with doses of 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 trophozoites of isolated Portland-1. For the accompaniment of the kinetics of the infection coprologics exams were made, daily, until the 35th day after the inoculation. Once detected in the feces, the cysts were separate for flotation in sucrose gradient and counted in Newbauer chamber. For the accompaniment of the development of histopathological alterations, 3 animals of each group were sacrificed on the 5, 17, 23 and 35 days after the inoculation. Three portions of the upper small intestine were removed. These were processed for the count of the trophozoites number stuck to the mucous membrane, for the histopathology analysis in HE and for scanning electron microscopy. Was observed pre-patent period of 12 days, with intermittent elimination until the 35th day after inoculation. Differences statistically significant were observed, among the medium number of recovered trophozoites, for group, in the days of sacrifice and positive correlation between inoculum dose and the number of recovered trophozoites. Morfometry was observed fall in the value of the villon/depth ratio in all the groups, when compared to the group it controls, being observed atrophy of the villon and hyperplasy of the depths. The scanning electron microscopy demonstrated, an increase in the mucus production in the inoculated animals and presence of trophozoites niches in the top and base of the villons. This study demonstrated that, the dose of the trophozoites inoculum doesn't interfere in the capacity to happen infection, nor in the development of alterations histopathological generated by the colonization of the intestine by trophozoites.

keywords: *Giardia duodenalis*, trophozoites, *Meriones unguiculatus*, histopathology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS:

Figura 1: Cinética de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* por grupo de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1, observada através dos valores médios de cistos eliminados por grupo. (Valores expressos em Média $\pm$ EP).**29**

Figura 2: Análise conjunta, por período de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis*, por grupo de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1. (Valores expressos em Média $\pm$ EP). ...**30**

Figura 3: Valores médios de trofozoítos de *Giardia duodenalis* por grupo, recuperados da mucosa intestinal de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Valores expressos em Média $\pm$ EP). **32**

Figura 4: Análise conjunta por dia de sacrifício, dos valores médios de trofozoítos de *Giardia duodenalis* por grupo, recuperados da mucosa intestinal de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Valores expressos em Média $\pm$ EP).....**34**

Figura 5: Fotomicrografias ópticas (10x) de biópsias intestinais (HE) de gerbils (*Meriones unguiculatus*), do grupo controle e inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland-1 de *Giardia duodenalis*. **A)** Grupo controle no 5º d.a.i, vilosidades digitiformes, bem orientadas e pouco infiltradas, razão vilon/cripta $\cong$ 6:1. **B)** Grupo E no 5º d.a.i, vilosidades reduzidas, vacuolizações apicais e criptas infiltradas, razão vilon/cripta $\cong$ 2:1. **C)** Grupo B no 17º d.a.i, vilosidades reduzidas, criptas infiltradas, razão vilon/cripta $\cong$ 4:1. **D)** Grupo C no 17º d.a.i, vilosidades reduzidas, infiltradas, edemaciadas e em menor densidade, razão vilon/cripta $\cong$ 4:1. **E)** Grupo F no 23º d.a.i, vilosidades infiltradas,

criptas hipertrofiadas, razão vilon/cripta $\cong$ 3:1. **F)** Grupo C no 35° d.a.i, observa-se processo de recuperação da mucosa em relação ao 17° d.a.i, razão vilon/cripta $\cong$ 5:1. **37**

Figura 6: Valores médios da razão vilon/cripta do intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*), dos grupos controle (A) e inoculados experimentalmente (B, C, D, E, F), com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1 *Giardia duodenalis*, analisados nos quatro dias de sacrifício. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (Valores expressos em Média $\pm$ EP). **38**

Figura 7: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura de fragmentos intestinais de gerbils (*Meriones unguiculatus*), inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland-1 de *Giardia duodenalis*. **A)** Grupo controle no 5° d.a.i (500X). Escassez de muco recobrindo a mucosa intestinal. **B)** Grupo B no 5° d.a.i (500x). Observar densa camada de muco recobrindo todo o fragmento. **C)** Grupo E no 23° d.a.i (1000x). Em destaque, trofozoítos imersos em muco na porção apical do vilon. **D)** Grupo F no 5° d.a.i (1000x). Presença de trofozoítos (ponta de seta) na região do ápice da vilosidade com traços de muco. **E)** Grupo F no 17° d.a.i (1000x). Nichos de trofozoítos (circulados) localizados na base da vilosidade. **F)** Grupo E no 17° d.a.i (500x). Nichos de trofozoítos (circulados) localizados na base e região mediana das vilosidades. **G)** Grupo E no 23° d.a.i (2000x). Trofozoítos (seta) em maior aumento. **H)** Grupo D no 17° d.a.i (2000x). Note a presença de marca circular (seta) no topo da vilosidade. **I)** Grupo F no 35° d.a.i. (500x). Não foram observados trofozoítos ou excesso de muco. **41**

TABELAS

Tabela 1: Comparação entre a análise morfométrica das vilosidades e criptas do intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*) dos grupos controle (A) e inoculados experimentalmente (B, C, D, E, F) com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1 de *Giardia duodenalis* nos quatro dias de sacrifício. **39**

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	01
2- OBJETIVOS.....	13
2.1- Geral	14
2.2- Específicos.....	14
3- JUSTIFICATIVA.....	15
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1- Modelo experimental	18
4.2- Divisão de Grupos	18
4.3- Isolado de trofozoítos	19
4.4- Ajuste do Inóculo	19
4.5- Inóculo Experimental.....	20
4.6- Determinação do período pré-patente	20
4.7- Determinação do número total de cistos eliminados	22
4.8- Necropsia dos animais	23
4.9- Análise morfométrica da mucosa intestinal	23
4.10- Análise da disposição dos trofozoítos na mucosa intestinal	24
4.11- Determinação do número de trofozoítos aderidos à mucosa	25
4.12- Análise estatística	26
5- RESULTADOS.....	27
5.1- Eliminação de cistos	28
5.1.1- Período pré-patente e cinética de eliminação.....	28
5.2- Trofozoítos aderidos à mucosa.....	31
5.3- Análise morfométrica	35

5.4- Disposição dos trofozoítos na mucosa intestinal.....	40
6- DISCUSSÃO	42
7- CONCLUSÕES	49
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
9- ANEXOS.....	73
9.1- Anexo A- soluções.....	74

Introdução

1. Introdução

Por mais de 300 anos os protozoários têm intrigado pesquisadores em todo o mundo. Dentre estes parasitos, o gênero *Giardia* merece destaque devido a sua ação patogênica, principalmente, em crianças e animais jovens (THOMPSON, 2000).

O gênero *Giardia* pertence à família Hexamitidae, ordem Diplomonadida, classe Zoomastigophorea e ao filo Sarcomastigophora. O parasito foi primeiramente visualizado por Antonie van Leeuwenhoek em 1681, mas sua descrição detalhada ocorreu em 1859 por Lambl.

Os parasitos deste gênero apresentam-se sob duas formas morfológicas. O cisto, forma infectante, é relativamente inerte e resistente, cujo formato pode variar entre redondo e ovóide medindo entre 11-14 μm de comprimento, por 7-10 μm de largura. Cada cisto contém quatro núcleos, axonemas, corpos medianos na forma de vírgula que representam primórdios do disco adesivo. O trofozoíto, estágio vegetativo do parasito, têm forma de gota medindo cerca de 10 a 20 μm de comprimento por 5-15 μm de largura, apresenta dois núcleos, quatro pares de flagelos, dois axonemas, um disco suctorial ou adesivo ventral e dois corpos medianos (LANE; LOYD, 2002).

Com o advento da microscopia eletrônica, a morfologia destes parasitos foi melhor descrita sendo, observado que o disco suctorial ocupa dois terços da superfície ventral. Constituído por uma estrutura rígida composta por vários microtúbulos igualmente espaçados entre si, o disco suctorial é circundado por uma extensão citoplasmática, orla ventrolateral, que em ação conjunta possibilitam a adesão do parasito à parede intestinal do hospedeiro (ADAM, 2001).

Citoplasmaticamente, os trofozoítos são constituídos por organelas como, ribossomos, retículo endoplasmático e um sistema secretório vesicular primitivo. A ausência de mitocôndrias, tem levado vários pesquisadores considerarem a *Giardia* como o elo perdido para o estudo da evolução dos eucariotos, pois esta reúne tanto características procariotas, como a ausência de mitocôndrias e peroxissomos, quanto características próprias de organismos eucariotos, como por exemplo, o sistema secretório vesicular, que é considerado arquétipo do complexo de Golgi (MARTI et al., 2003).

Mais de 50 espécies de *Giardia* foram descritas sendo a maioria entre 1920 e 1930 (THOMPSON; LYMBERY; MELONI, 1990; KULDA; NOHYNKOVA, 1996; THOMPSON, 2002).

Filice, em 1952, propôs a nomenclatura baseada em critérios morfológicos, onde o gênero compreenderia três grupos específicos, considerando similaridades morfológicas entre as espécies e a especificidade de hospedeiro. O grupo *Agilis* com a espécie *Giardia agilis* acometendo anfíbios; o grupo *Muris*, cuja espécie *Giardia muris* acomete roedores e o terceiro maior grupo, *Duodenalis*, com a espécie *Giardia duodenalis* (sinonímia *G. lamblia*, *G. intestinalis*) acometendo grande quantidade de mamíferos inclusive o homem. Atualmente, 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*, parasito de periquitos, *Giardia ardeae*, em garças, ambas anteriormente descritas como *G. duodenalis* e mais recentemente a *Giardia microti* parasito de roedores do

campo (*Microtus ochrogaster*) e do rato-almiscarado (*Ondatra zibethicus*) (MONIS; THOMPSON, 2003).

O desenvolvimento de técnicas de cultura axênica e análises aloenzimáticas possibilitaram a caracterização de isolados obtidos de diversos hospedeiros indicando a existência de diferenças genotípicas e fenotípicas, suficientes para considerarem *Giardia duodenalis* um complexo (THOMPSON, 1998; THOMPSON et al., 1999, THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; MONIS, THOMPSON, 2003).

Desta forma, a espécie *G. duodenalis* apresenta-se dividida em 7 sublinhagens (*Assemblages*). A sublinhagem **A** “Polish” apresenta pouca diversidade genotípica acometendo mamíferos. Nesta, o subgrupo **A-I** compreende isolados humanos e de animais pouco diversos geneticamente. O subgrupo **A-II**, engloba apenas isolados de origem humana. A sublinhagem **B** “Belgian” apresenta um maior grau de diversidade genotípica, acometendo o homem e outras espécies de mamíferos, porém em menor escala. As sublinhagens C e D acometem cães, a sublinhagem E rebanhos de animais de casco e as sublinhagens F e G abriga isolados de gatos e ratos, respectivamente (THOMPSON; HOPKINS; HOMAN, 2000; MONIS; THOMPSON, 2003).

A *G. duodenalis* apresenta ciclo biológico direto, iniciado pela ingestão de cistos presentes na água ou alimentos contaminados que, mediante a exposição ao pH ácido dos fluídos digestivos, excistam na região inicial do intestino liberando um excizoíto que rapidamente se divide em 4 trofozoítos (BERNANDER; PALM; SVÄRD, 2001).

Após a liberação, os trofozoítos iniciam o processo de multiplicação por fissão binária longitudinal, nas criptas do duodeno e jejuno superior. Os trofozoítos podem

colonizar diferentes porções do intestino, no entanto a maioria destes aderem às microvilosidades das células epiteliais da porção inicial do intestino. A ação dos sais biliares e dos mecanismos de resposta do hospedeiro, responsáveis pelo destacamento dos trofozoítos das mucosas, induzem 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, não conhecidos claramente. Em resposta a esta ativação, inicia-se a biogênese de organelas secretoras que realizarão a síntese, empacotamento, transporte e liberação dos constituintes da parede cística, que possibilitará a sobrevivência dos cistos por até 8 semanas no meio ambiente (LUJAN, MOWATT; NASH, 1998; ZAJAC; JOHNSON; KING, 2002)

O período pré- patente na giardíase humana varia entre 1 e 45 dias nos pacientes sintomáticos, apesar de 60 % das infecções serem assintomáticas, principalmente em crianças e adultos que já desenvolveram infecções anteriores.

A transmissão da giardíase ocorre, principalmente, de forma indireta por contaminação oro-fecal, pela ingestão de água ou alimentos contaminados contendo os cistos do parasito (THOMPSON, 1998). O consumo de água não tratada ou tratada ineficazmente, 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).

A transmissão direta, pessoa a pessoa, constitui uma 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 ainda entre praticantes de sexo anal. (ORTEGA; ADAM, 1997).

Desde 1979, quando a Organização Mundial de Saúde passou a considerar o potencial zoonótico da giardíase (WHO, 1979), o contato animal-pessoa tem sido estudado (KENNEDY, 1989; BORDEAU, 1993; ZAJAC, 1999).

Kennedy (1989) constatou a existência de linhagens com maior especificidade para hospedeiros que as demais, apontando a existência de apenas evidências circunstanciais, porém bastante sugestivas, do caráter zoonótico da giardíase. Isolados de *Giardia* spp. em cães têm sido identificados como *G. duodenalis* dos genótipos A e B, sendo estes, também, responsáveis pela giardíase humana (vanKEULEN et al., 2002; ABE; KIMATA; ISEKI, 2003). Em estudos recentes isolados provenientes de gatos e ruminantes foram morfo-geneticamente idênticos ao isolado humano, o que tem reforçado a tese de possível potencial zoonótico para esta parasitose (BURET; GALL; OLSON, 1990; BUGG et al., 1999). Em 2002 vanKeulen et al. confirmaram que os genótipos A e B de *G. duodenalis* podem parasitar animais domésticos e rurais, apesar de não estar claro se estes animais agem como reservatórios para o homem ou vice-versa na transmissão da *G. duodenalis*.

Para que ocorra a transmissão da giardíase são necessários entre 1 e 10 cistos, mesmo existindo divergências expressivas entre os diferentes isolados no que tange a virulência e diversidade antigênica (HEALTH CANADÁ, 2004). No entanto, estudos com animais experimentais têm demonstrado que a inoculação de quantidades

inferiores a 10 cistos resultam em infecção efetiva, porém com período pré-patente maior (HEALTH CANADÁ, 2004).

O estado imunológico do hospedeiro, tem grande relevância na acentuada variabilidade de sintomatologia produzida pela *G. duodenalis*. Em 1989, Farthing tentando explicar o fenômeno da má-absorção, relatou que a IgE desempenha papel importante durante as infecções por *G. duodenalis*. A IgE seria responsável pelo desenvolvimento de reação anafilática local, determinando edema de mucosa, acompanhado da contração da musculatura lisa e renovação acentuada dos enterócitos, resultando, portanto, na presença de células imaturas, e deficiência na ação de enzimas na luz intestinal.

Em pacientes hipogamaglobulínicos, apresentando a forma crônica da giardíase (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993), pode ser constatada a presença de anticorpos circulantes no soro (IgG, IgM e IgA) e na mucosa intestinal (IgA), assim como, reação imunológica celular mediada por linfócitos T timo-dependentes. Estas observações demonstram a importância dos mecanismos não imunes, como a acidez do suco gástrico, muco, peristaltismo e produtos tóxicos da lipólise, na susceptibilidade à infecção, duração e severidade da giardíase (FARTHING; CHONG; WALKER-SMITH, 1984; GOTTSTEIN; NASH, 1991).

Os pacientes sintomáticos podem apresentar variada sintomatologia tais como diarreia aguda ou crônica, caracterizada por cólicas abdominais, náuseas, anorexia, flatulência, esteatorréia, síndrome de má-absorção e perda de peso (UNGAR et al., 1984). A má-absorção de lípidos, proteínas, carboidratos, vitamina A e B12 (HALL, 1994), a perda de peso, aliadas à frequência e duração da infecção e a oportunidade de

reinfeção (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993), têm sido, freqüentemente, identificadas como os principais fatores favorecedores do atraso de crescimento entre crianças (GOLDIN et al., 1990). Devido a essas manifestações, a partir de 1981, a Organização Mundial de Saúde, incluiu a *G. duodenalis* na listagem dos organismos patogênicos conhecidos (FAUBERT, 2000).

De maneira geral, a histopatologia do órgão infectado pela *Giardia* apresenta-se sob a forma de intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria, edemaciamento da mucosa e interstício, perda das microvilosidades, aumento na produção de muco e em casos mais graves, necrose e destacamento da mucosa, além da obstrução de pequenos vasos (BRANDBORG et al., 1967; FERGUSON; McCLURE; TOWNLEY, 1976; KIRKPATRICK, 1987).

De acordo com Meyer e Radulescu (1979) esse quadro histopatológico e a formação de uma barreira física imposta pela aderência dos trofozoítos à mucosa, seria o principal mecanismo de impedimento à absorção de nutrientes.

Farthing (1989) cita que a atrofia das vilosidades, a perda de microvilosidades, e a disfunção da mucosa por aumento do número de linfócitos intraepiteliais, são resultados do intenso processo inflamatório, desencadeado pela fixação do parasito à mucosa, e responsáveis pela queda da absorção normal de nutrientes pela mucosa intestinal.

Por outro lado, Hall (1994) propôs que a co-infecção por bactérias resulta na liberação de metabólitos no lúmen intestinal. Esta possibilitaria a quebra dos sais biliares, responsáveis pela emulsificação dos lipídeos, o que impediria a sua absorção.

A *G. duodenalis* apresenta ampla distribuição mundial atingindo tanto países desenvolvidos, como em desenvolvimento, sendo que, essa distribuição mundial pode estar relacionada ao fato de que os cistos, uma vez liberados, podem permanecer viáveis por semanas e até meses sob condições de temperatura e umidade favoráveis (ORTEGA; ADAM, 1997).

Na Ásia, África e América Latina, cerca de 200 milhões de pessoas apresentam giardíase sintomática e outros 500 mil novos casos são reportados a cada ano (THOMPSON, 2000). Em países como os Estados Unidos, Austrália, Canadá e Reino Unido a prevalência apresenta-se em torno de 2-7% (THOMPSON; LYMBERG; MELONI, 1990). Nos Estados Unidos a *Giardia* spp. é o enteroparasito mais prevalente (FLORENCIO, 1990), sendo a giardíase a principal causa das epidemias de diarreia veiculada pela água.

No Brasil a giardíase acomete cerca de 30% da população, estando essa prevalência altamente associada à localidade, à população estudada e à metodologia utilizada. Estudos demonstram que, a faixa etária mais acometida é a de crianças de oito meses a dez anos, constituindo um grave problema de saúde pública.

Vários trabalhos epidemiológicos têm sido 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) e 18 e 20% quando tanto crianças, quanto adultos foram examinados (ROCHA et al., 1983; COSTA et al., 1992; NUNES et al., 1993; COSTA-CRUZ; CARDOSO; MARQUES., 1995). Estudos mais recentes, utilizando-se o método de Faust, encontraram 31,7% de positividade entre 41

crianças examinadas em Belém- PA (MACHADO et al.,2001) e 27,4% entre 157 crianças em Fortaleza- CE (NEWMAN et al.,2001).

Apesar da grande importância da giardíase como problema de saúde pública, seu diagnóstico ainda é impreciso e insatisfatório (STIBBS; SAMADPOUR; MANNING, 1988). O método mais utilizado, rotineiramente, é a demonstração dos trofozoítos e cistos presentes nas fezes dos pacientes. Este método nem sempre é considerado eficaz, pois 50-70% dos pacientes não demonstram o parasito num único exame de fezes, sendo recomendado, a colheita de três amostras fecais, colhidas em dias alternados, devido ao caráter variável da eliminação das formas nas fezes (UNGAR et al., 1984; HEYMANS; ARONSON; van HOOFT, 1987).

Outras metodologias como a pesquisa de trofozoítos no fluído duodenal e a biópsia de intestino delgado (ROSSOF; STIBBS, 1986) podem ser utilizadas, sendo estas mais caras e agressivas (BEAL; GRANT; HUGHES, 1970) além de pouco mais sensíveis que o exame parasitológico (SUZUKI et al., 1994).

Nos exames parasitológicos os resultados negativos são comuns, devido à dificuldade encontrada para a demonstração do parasito o que levou à pesquisa por métodos sorológicos. Os métodos de identificação sorológica, como as técnicas de reação de imunofluorescência (RIDLEY; RIDLEY, 1976; VISVEVARA et al., 1980; WITTNER et al., 1983) e de reação imunoenzimática (SMITH et al., 1981; HARALABIDIS, 1984; WITTNER et al., 1983) são pouco eficientes, devido a ausência de correlação entre as reações positivas e a presença de infecção ativa (HARALABIDIS,1984; ROSSOF; STIBBS, 1986).

O ELISA de captura (UNGAR et al., 1984; YOLKEN; UNGAR, 1985; ROSSOF; STIBBS, 1986; ROSSOF et al., 1989) é altamente sensível e específico, sendo necessária apenas uma amostra de fezes para o exame.

Vários “kits” de pesquisa de coproantígenos para o diagnóstico das giardíases têm sido desenvolvidos tais “kits” possuem boa especificidade e sensibilidade, além da vantagem da agilidade da execução e interpretação da técnica, podendo ser de grande utilidade em levantamentos epidemiológicos.

Na maioria dos pacientes, não submetidos à tratamento específico, a infecção é eliminada espontaneamente juntamente aos sintomas após algumas semanas (WOLFE, 1992; THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993). Ocasionalmente, estes podem persistir, a ponto de comprometer o bom funcionamento do organismo requerendo tratamento (THOMPSON; REYNOLDSON; MENDIS, 1993).

Várias bases medicamentosas estão disponíveis para o tratamento de pacientes sintomáticos com giardíase. O metronidazol (15 mg/Kg/dia durante 5 dias) é o medicamento mais utilizado, mas em casos mais graves, há a necessidade de tratamento múltiplo ou combinado (ORTEGA; ADAM 1997). Em mulheres grávidas o tratamento deve ser realizado com paramonicina (25-30mg/kg/dia em 3 doses durante 7 dias), em detrimento dos outros medicamentos devido ao efeito teratogênico destes (HILL, 1993).

Na busca de novos dados sobre o desenvolvimento e patogenia da infecção por *G. duodenalis*, vários modelos experimentais têm sido propostos sendo utilizados freqüentemente como castores, ratos filhotes e adultos (SEHGAL et al., 1976; VINAYAK; SHARMA; NAIK, 1979; CRAFT; NELSON, 1982; HILL et al., 1983),

coelhos (SCHLEINITZ et al., 1983), cães (HEWLETT et al., 1982), gatos (KIRKPATRICK; GRENN, 1985) e gerbils (*Meriones unguiculatus*) (BELOSEVIC et al., 1983), entretanto bons resultados só foram obtidos nos modelos experimentais em gerbils e filhotes de hamster.

A boa positividade na infecção de filhotes de hamster por *G. duodenalis* encontrada por Hill et al. (1983) foi relacionada à imaturidade do sistema imune destes indivíduos. Os autores observaram que a susceptibilidade depende da idade, diminuindo após o 14º dia e extinguindo-se após o 21º dia. Este comportamento reduz grandemente a utilização destes animais, para estudos de imunidade e patogenicidade. A ausência de alterações morfológicas na mucosa intestinal durante a infecção nestes animais, impede o uso deste modelo para o desenvolvimento de estudo sobre a patogenia por *G. duodenalis*, indicando a necessidade de um evento espécie-específico, como por exemplo, a relação parasito-hospedeiro, para que haja o desenvolvimento da doença.

Segundo Faubert et al., (1983), o animal que mais se adequa como modelo experimental para *Giardia duodenalis* é o gerbil (*Meriones unguiculatus*), devido ao seu tamanho, facilidade de manipulação, alta susceptibilidade à infecções por inoculação oral de cistos e trofozoítos e pela grande quantidade de eliminação de cistos nas fezes (BELOSEVIC et al., 1983; FAUBERT et al., 1983; VISVESVARA; DICKERSON; HEALY, 1988; BURET; GALL; OLSON, 1991; MOHAMMED; FAUBERT, 1995). Estes animais são, também, bons modelos experimentais para os estudos de histopatologia. Belosevic, Faubert e Maclean (1989) encontraram nestes modelos, diminuição na razão entre a altura das vilosidades e das criptas intestinais e redução, de até 85%, na atividade das dissacaridases maltase, isomaltase e sacarase a partir do décimo dia pós infecção, sendo este padrão bastante

semelhante ao encontrado nas infecções humanas por *Giardia duodenalis* (WU et al.,1989). Este modelo experimental é, também, utilizado para a realização de estudos epidemiológicos, devido a possibilidade de se testar a viabilidade dos cistos e para a identificação dos agentes etiológicos (FAUBERT et al. 1983).

Em face da ampla distribuição mundial, da sua importância clínica, do possível caráter zoonótico e da incerteza sobre o real mecanismo de patogenicidade desta parasitose, novos estudos abrangendo os mais diversos níveis de conhecimento sobre este parasito são necessários, na tentativa de elucidar as lacunas no comportamento do parasito no hospedeiro.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Geral

Observar a cinética da infecção e o desenvolvimento de alterações no intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*), inoculados experimentalmente com diferentes doses de inóculo de trofozoítos de isolado humano de *Giardia duodenalis*.

2.2 Específicos

- Determinar o período pré-patente da infecção para as diferentes doses de inóculo de trofozoítos;
- Observar a cinética da infecção;
- Observar por histopatologia, as lesões presentes na superfície da mucosa intestinal de gerbils inoculados experimentalmente;
- Avaliar a influência da dose de inóculo de trofozoítos no desenvolvimento das alterações histopatológicas intestinais;
- Observar a existência da relação entre o número de trofozoítos aderidos à mucosa duodenal e dose de inóculo;
- Observar a distribuição dos trofozoítos na superfície epitelial do intestino delgado, por de microscopia eletrônica de varredura.

Justificativa

3. Justificativa

As giardíases estão presentes em todo o mundo independente de condições culturais ou sócio-econômicas. Essa ampla distribuição, aliada a facilidade de transmissão e ao possível caráter zoonótico desta parasitose, têm instigado o desenvolvimento de pesquisas.

Poucos trabalhos têm foco no esclarecimento das alterações histopatológicas promovidas pelo parasito, restringindo-se à descrição de lesões encontradas em humanos ou em animais experimentais, muitas vezes desconsiderando o efeito da dose de inóculo.

As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de lesões histopatológicas em decorrência da giardíase em humanos, são, muitas vezes, impossibilitadas devido a dificuldades existentes na condução de estudos controlados. A dificuldade no controle destes estudos deve-se à exposição freqüente do homem às diversas fontes de contaminação durante a realização de atividades diárias além de outros fatores relacionados.

Gerbils (*Meriones unguiculatus*), uma vez inoculados experimentalmente, com trofozoítos ou cistos de *Giardia duodenalis* têm apresentado resultados bastante similares àqueles observados em humanos naturalmente infectados.

Desta forma o presente trabalho busca elucidar a influência da dose do inóculo no desenvolvimento de lesões histopatológicas em gerbils (*Meriones unguiculatus*) na giardíase, além do melhor entendimento quanto ao desenvolvimento destas lesões.

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Modelo experimental

Neste estudo foram utilizados 72 gerbils (*Meriones unguiculatus*) livres de parasitos, de ambos os sexos, com idade de 8 semanas. Os animais foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde eram mantidos sob condições controladas à temperatura de 22°C e umidade relativa de 40% com foto-períodos de 12 horas.

Antes do início do experimento, foram realizados exames coprológicos em todos os animais, durante 7 dias para a verificação da ausência de qualquer parasitose.

4.2 Divisão de grupos

Os animais foram divididos em 6 grupos (A a F) contendo 12 animais mantendo-se a mesma proporção de machos e fêmeas, individualmente marcados com ácido pícrico (10%). O grupo A foi considerado controle e os demais (B ao F), inoculados experimentalmente. Estes foram colocados em gaiolas, em sub-grupos de 6 animais, recebendo água mineral, ração comercial para roedores autoclavada *ad libitum* e mantidos em sala com ambiente controlado, à temperatura de 22°C e umidade relativa de 40% com foto-períodos de 12 horas. Os cuidados com a água e a ração garantiram a inexistência de qualquer outra fonte de infecção para estes animais, durante todo o período de estudo.

As condições de experimentação e de manutenção dos animais estavam de acordo com as normas de ética para experimentação animal propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (COBEA,1991).

4.3 Isolado de trofozoítos

Foram utilizados trofozoítos do isolado Portland- 1 (ATCC 30888), *Assemblage* A, provenientes do Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais, onde eram mantidos em cultura em meio TYI-S-33 (DIAMOND; HARLOW; CUNNICK, 1978), modificado por Keister (1983) e suplementado com soro bovino.

Para manutenção da cultura foram realizados repiques a cada 72/96 horas, sendo os tubos mantidos em posição inclinada em estufa bacteriológica sob temperatura entre 35,5°C e 37°C. Os trofozoítos foram obtidos na fase de crescimento exponencial, entre 48 e 72 horas, acondicionados em caixa térmica, mantendo-se temperatura constante de 37°C e encaminhados para Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Deve-se ressaltar que a escolha do isolado Portland- 1 para o inóculo neste estudo, foi devido a existência de completa caracterização molecular deste.

4.4 Ajuste do inóculo

Para o inóculo foram realizados ajustes, que possibilitassem a quantidade desejada de trofozoítos em 1 mL de solução, considerando os protocolos utilizados nos experimentos de Hewlett et al. (1982).

A quantidade de trofozoítos presentes em cada tubo de cultura, proveniente da UFMG, foi determinada mediante a imersão destes, em banho de gelo, por 20 minutos, para o desprendimento das formas evolutivas do parasito da parede dos recipientes. Após este tempo, 0,1 mL da cultura de trofozoítos foi retirado e depositado em outro tubo de ensaio, sendo adicionado 0,5 mL de PBS, 0,4 mL de corante vital e uma gota de formol, com posterior homogeneização. Desta solução foi retirado 0,01mL, procedendo-se a contagem do número total de trofozoítos em câmara de Neubauer, considerando-se apenas os quatro maiores quadrantes.

Cada tubo de cultura continha em média $4,64 \times 10^7$ trofozoítos por mL, essa quantidade foi ajustada por diluição seriada, em meio de cultura livre de trofozoítos, de maneira que fosse possível a inoculação das diferentes doses.

4.5 Inóculo experimental

A inoculação foi realizada por via oral, utilizando-se cânula DELVO (n° 15) acoplada a seringa de 5mL.

Os animais do grupo A (controle) receberam como inóculo 1mL de meio de cultura livre de trofozoítos. Os demais grupos, B, C, D, E, e F receberam doses crescentes de trofozoítos, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , e 10^5 trofozoítos, diluídos em 1mL de meio de cultura, respectivamente.

4.6 Determinação do período pré-patente

Para a determinação do período pré-patente e acompanhamento da cinética da infecção, foram realizados, diariamente, a partir do primeiro dia após a inoculação

(d.a.i.) e durante os 35 dias de período experimental, exames coprológicos utilizando o método de flutuação em sulfato de Zinco (FAUST et al., 1939) no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Para a coleta das fezes e realização dos exames coprológicos, os animais foram colocados, individualmente, durante duas 2 horas, em gaiolas plásticas, previamente higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 1% e enxaguadas com água mineral.

A quantidade total de fezes eliminadas durante este período, foi coletada e homogeneizada com 20mL de água destilada sendo em seguida filtrada. O filtrado foi centrifugado por 1 minuto à 1500g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em água destilada, completando o volume de 15 mL e novamente centrifugado. Foram realizadas centrifugações, até a obtenção de sobrenadante claro. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento homogeneizado foi resuspenso em solução de sulfato de Zinco a 33% (densidade 1,180) até completar o volume de 15 mL, sendo realizada nova centrifugação a 1500g por 2 minutos. Após este tempo o tubo permaneceu em repouso por 10 minutos, sendo em seguida, coletado o material de superfície do sobrenadante com o auxílio de uma alça de platina. O material coletado foi depositado sobre lâmina, contrastado com solução de lugol, coberto com lamínula e em seguida observado ao microscópio óptico Olympus CH-2 (Olympus, Japão), nas objetivas de 10x e 40x para a pesquisa de cistos e trofozoítos de *Giardia*.

4.7 Determinação do número total de cistos eliminados

Após a detecção da presença de cistos nas fezes, o número total de cistos eliminados por cada animal, foi quantificado pelo método de flutuação em gradiente de sacarose proposto por Roberts-Thomson et al. (1976) com modificações.

A quantidade total de cistos eliminados, por animal, durante o período de 2 horas foi diluída em água destilada na proporção de 1:5. Essa solução foi filtrada em gase dobrada por quatro vezes e em seguida, centrifugada por 5 minutos a 1500g. Tal procedimento foi repetido até a obtenção de sobrenadante límpido. Este foi dispensado e o seu 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 em seguida centrifugada a 500g, durante 20 minutos. Após esta primeira centrifugação, os cistos concentrados na interfase água-sacarose, foram cuidadosamente transferidos para outro tubo e centrifugados com água destilada por 10 minutos a 1500g. O sedimento obtido foi ressuspense em 3 mL de água destilada. Em outro tubo de 15 mL, foram adicionados 3 mL de solução de sacarose 0,75M e sobre esta os 3 mL da solução de cistos previamente obtida. Essa solução foi centrifugada a 500 g por 10 minutos. Os cistos foram retirados, cuidadosamente, da interfase água-sacarose, ressuspensos em água destilada, centrifugados por duas vezes com 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.

4.8 Necropsia dos animais

Para a quantificação do número de trofozoítos aderidos à mucosa e para a realização dos estudos histopatológicos, três animais de cada grupo (controle e infectados), foram previamente anestesiados em câmara de CO₂ e sacrificados, por deslocamento cervical, de acordo com as normas de ética para experimentação animal propostas pela COBEA (COBEA,1991), no 5º, 17º d.a.i, 23º d.a.i, e 35º d.a.i. A escolha destas datas foi baseada na literatura que indica o início de eliminação de cistos em torno do 7 d.a.i., pico de eliminação no 14º d.a.i. e término da infecção à partir do 30º d.a.i. (BELOSEVIC et al, 1983).

A necropsia dos animais ocorreu mediante a realização de uma incisão transversal na região cérvico-lateral para evisceração foi retirado todo o intestino delgado, cuidadosamente, a partir da junção gastroduodenal. Em seguida, foi retirado segmento de aproximadamente 3 cm, sendo este dividido em três segmentos de 1 cm de comprimento cada.

4.9 Análise morfológica da mucosa intestinal

Para a análise do desenvolvimento de alterações histopatológicas no intestino delgado dos animais, o primeiro segmento foi processado no Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia para confecção de lâminas histopatológicas.

O primeiro segmento foi fixado em formol tamponado com fosfato de sódio (10%), e posteriormente incluído em parafina, cortados na espessura de 3 µm e corados por hematoxilina-eosina.

Para a análise da razão vilon/crípta, foram medidas, utilizando ocular micrométrica Olympus 10X em microscópio óptico, as alturas de 10 vilosidades e 10 criptas adjacentes e bem orientadas, em três cortes distintos para cada animal, de acordo com Roberts-Thomson et al. (1976). As principais alterações foram registradas em meio digital em fotomicroscópio Reichert Jung- Polyvar.

4.10 Análise da disposição dos trofozoítos na mucosa intestinal

O segundo segmento intestinal foi processado para microscopia eletrônica de varredura, segundo procedimento proposto por Poley e Rosenfield, (1982) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O segmento intestinal foi, cuidadosamente, aberto longitudinalmente e em seguida colocado imediatamente em líquido fixador, solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,3) a 4°C durante 12 horas. Após este período, os segmentos foram transferidos para solução de tampão cacodilato de sódio 0,2M acrescido de 10% de sacarose e armazenados a 4°C até a data do término do processamento.

No momento do processamento os segmentos foram lavados por três vezes, em tampão cacodilato 0,1M, durante 10 minutos para a retirada da sacarose. Em seguida, os segmentos foram pós-fixados por 2 horas, em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M, (pH 7,3) e novamente lavados, em três trocas do tampão cacodilato 0,1M totalizando 30 minutos.

Para a desidratação, os segmentos passaram por bateria de álcoois nas concentrações de 50%, 75%, 95% e 100%, permanecendo 2 vezes em cada concentração, por 10 minutos. Em seguida, foram desidratados ao ponto crítico em CO₂ líquido em aparelho BALZERS MODELO CPD 030.

Os segmentos foram, fixados em suporte de alumínio com cola metálica, sendo metalizados com partículas de ouro paladium, em três ciclos de 4 minutos em aparelho EMITECH- K 650.

Os segmentos foram observados em microscópio eletrônico de varredura ZEIZ DSM-940-A, acoplado a um equipamento digital de captação de imagens.

4.11 Determinação do número de trofozoítos aderidos à mucosa intestinal

O terceiro segmento foi processado, segundo a metodologia proposta por Belosevic et al., (1983) para a contagem dos trofozoítos aderidos à mucosa.

Após a excisão, o segmento foi depositado em frasco de vidro, rosqueado, com capacidade de 15 mL, contendo 10 mL de PBS (pH 7.0-7.2) a 4°C por aproximadamente 15 minutos. Após este período, o intestino delgado foi perfundido com o PBS do frasco e centrifugado, por 10 minutos à 2500 rpm com a finalidade de concentrar os trofozoítos. O sobrenadante foi aspirado, cuidadosamente, utilizando pipeta de transferência, deixando o sedimento em 2mL de PBS.

A quantificação do número de trofozoítos, foi realizada mediante a contagem de 2 amostras de 0,1mL de sedimento em câmara de Neubauer.

4.12 Análise Estatística

Para a comparação entre os dados obtidos nos diferentes grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando significativas diferenças com $p < 0,05$. Para a análise de correlação entre variáveis, foi utilizado o teste de correlação de Spearman (SAMPAIO, 1998). Todos os cálculos foram realizados utilizando o software GraphPad® Prism 4.0 (GRAPHPAD SOFTWARE, Inc.).

Resultados

5. Resultados

5.1 Eliminação de cistos

Todos os animais inoculados com trofozoítos do isolado Portland-1, independente da dose, apresentaram-se positivos para a infecção por *Giardia duodenalis* comprovado pela eliminação de cistos nas fezes dos animais.

5.1.1 Período Pré-patente e cinética de eliminação

O período pré-patente observado foi de 12 dias para todos os grupos, sendo determinado pela visualização dos primeiros cistos nas fezes. A eliminação manteve-se de forma intermitente e em quantidade variável, até o 35º d.a.i..

O maior número de cistos eliminados pelos animais dos grupos B, D e E ocorreu entre 12º e 17º d.a.i. com a eliminação média de 606, 1041 e 865 cistos por grupo, respectivamente, durante o período de 2 horas. Os animais dos grupos E e F eliminaram maior número de cistos, 865 e 5.625 cistos/2h respectivamente, entre 18º e 23º d.a.i. Não foi observada diferença estatisticamente significativa, no número médio de cistos eliminados pelos animais do mesmo grupo, nos diversos dias de experimento (Figura 1).

Analisando conjuntamente os dados obtidos para todos os grupos, não foi observada diferença estatisticamente significativa, no número médio de cistos eliminados pelos animais de cada grupo num mesmo dia de coleta (Figura 2).

Não foi observada qualquer alteração clínica nos animais experimentais durante o período do estudo.

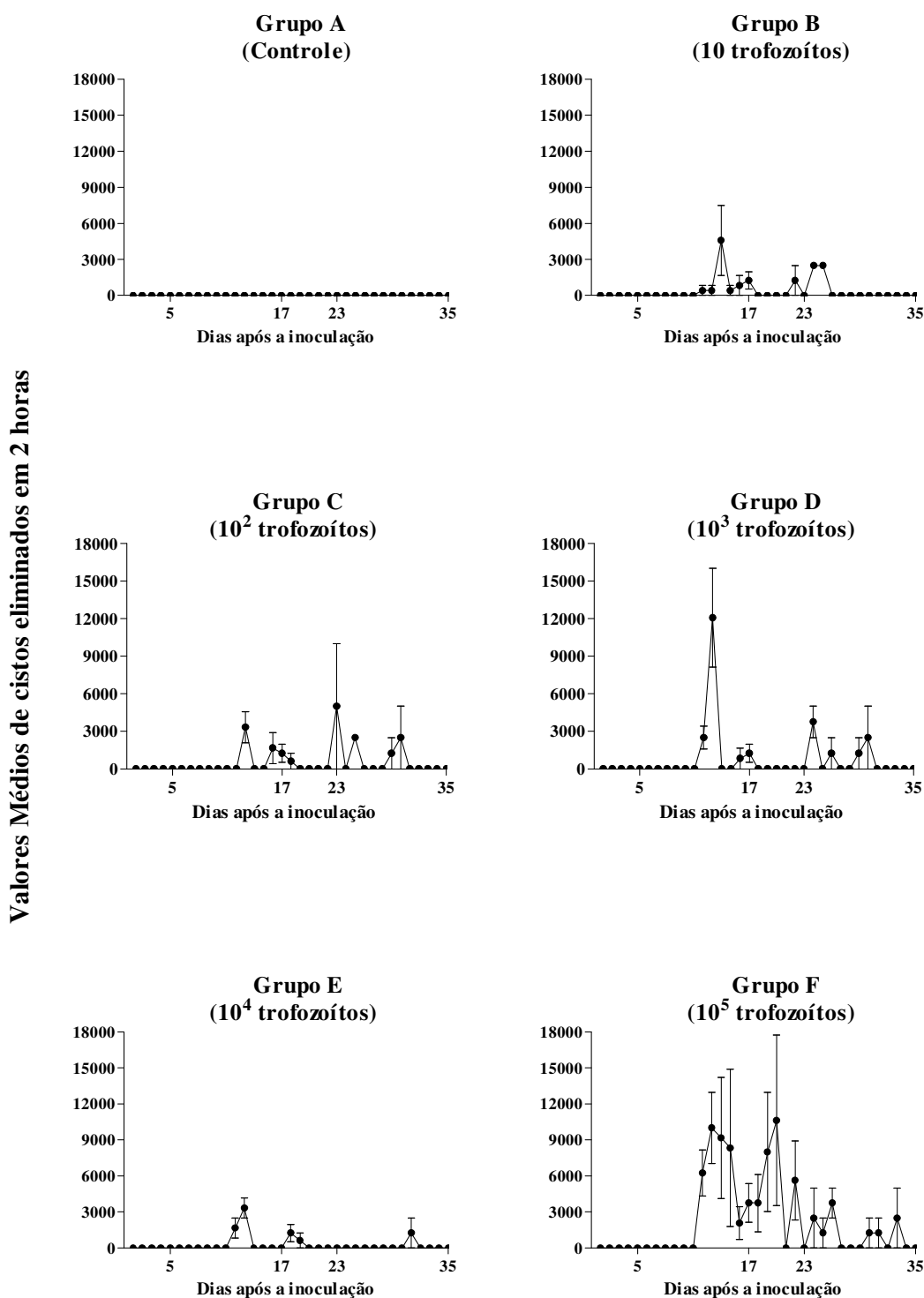


Figura 1: Cinética de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis* por grupo de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1, observada através dos valores médios de cistos eliminados por grupo. (Valores expressos em Média $\pm$ EP).

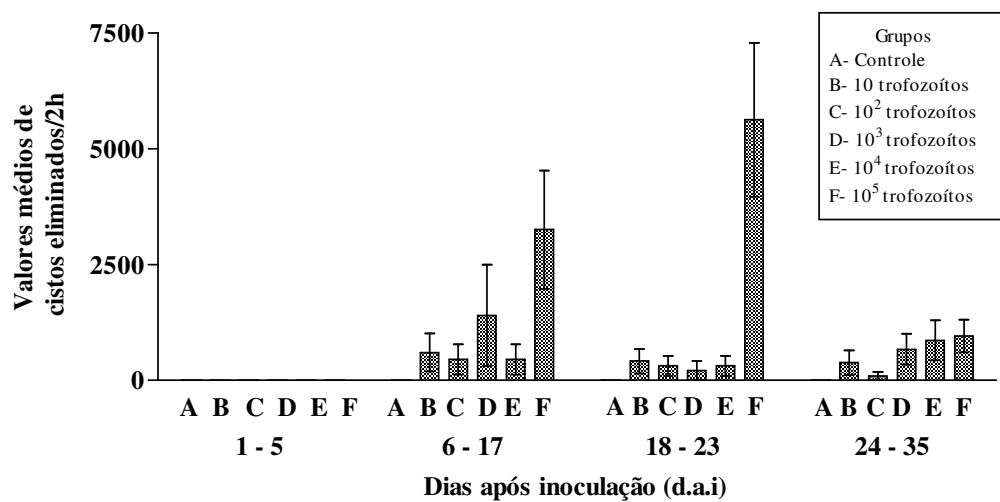


Figura 2: Análise conjunta, por período de eliminação de cistos de *Giardia duodenalis*, por grupo de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1. (Valores expressos em Média $\pm$ EP).

5.2 Trofozoítos aderidos à mucosa

A colonização intestinal por trofozoítos pode ser observada, em todos os grupos inoculados, a partir do 5° d.a.i. até o 35° d.a.i..

Para os grupos B, C e D, a maior média de trofozoítos recuperados, foi observada no 23° d.a.i. ($4,45 \times 10^6$, $3,2 \times 10^6$ e $3,95 \times 10^6$ trofozoítos/mL respectivamente), sendo os valores estatisticamente superiores ao obtido no 5° d.a.i. ($p < 0,01$) para estes grupos e no 35° d.a.i. para os grupos B e C com $p < 0,01$ e para o grupo D com $p < 0,001$. No grupo D, também, se observou que o número médio de trofozoítos recuperados no 17° d.a.i., foi superior ao recuperado no 35° d.a.i. ($p < 0,05$).

No grupo E a maior média de trofozoítos recuperados diretamente da mucosa, foi obtida no 17° d.a.i, $6,25 \times 10^6$ trofozoítos/mL, sendo este valor superior ao recuperado no 5° e no 35° d.a.i. ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente). No 35° d.a.i., o número médio de trofozoítos recuperados nos animais do grupo E, foi inferior ($p < 0,05$) ao recuperado no 23° d.a.i..

Nos animais pertencentes ao grupo F, o maior número médio de trofozoítos recuperados em cada animal ($6,2 \times 10^6$ trofozoítos/mL), foi obtido no 5° d.a.i. , sendo este valor estatisticamente superior ao eliminado no 35° d.a.i. ($p < 0,001$) (Figura 3).

A análise em conjunto de todos os grupos demonstrou que, o número de trofozoítos recuperados da mucosa dos animais do grupo F no 5° d.a.i ($6,2 \times 10^6$ trofozoítos/mL), foi estatisticamente superior ao recuperado nos grupos B e C ($p < 0,01$, e $p < 0,05$ respectivamente). Neste mesmo dia, o número de trofozoítos recuperados da mucosa dos animais do grupo E, foi estatisticamente superior ao grupo B ($p < 0,05$). No 17° d.a.i. a quantidade de trofozoítos recuperados da mucosa dos animais do grupo E

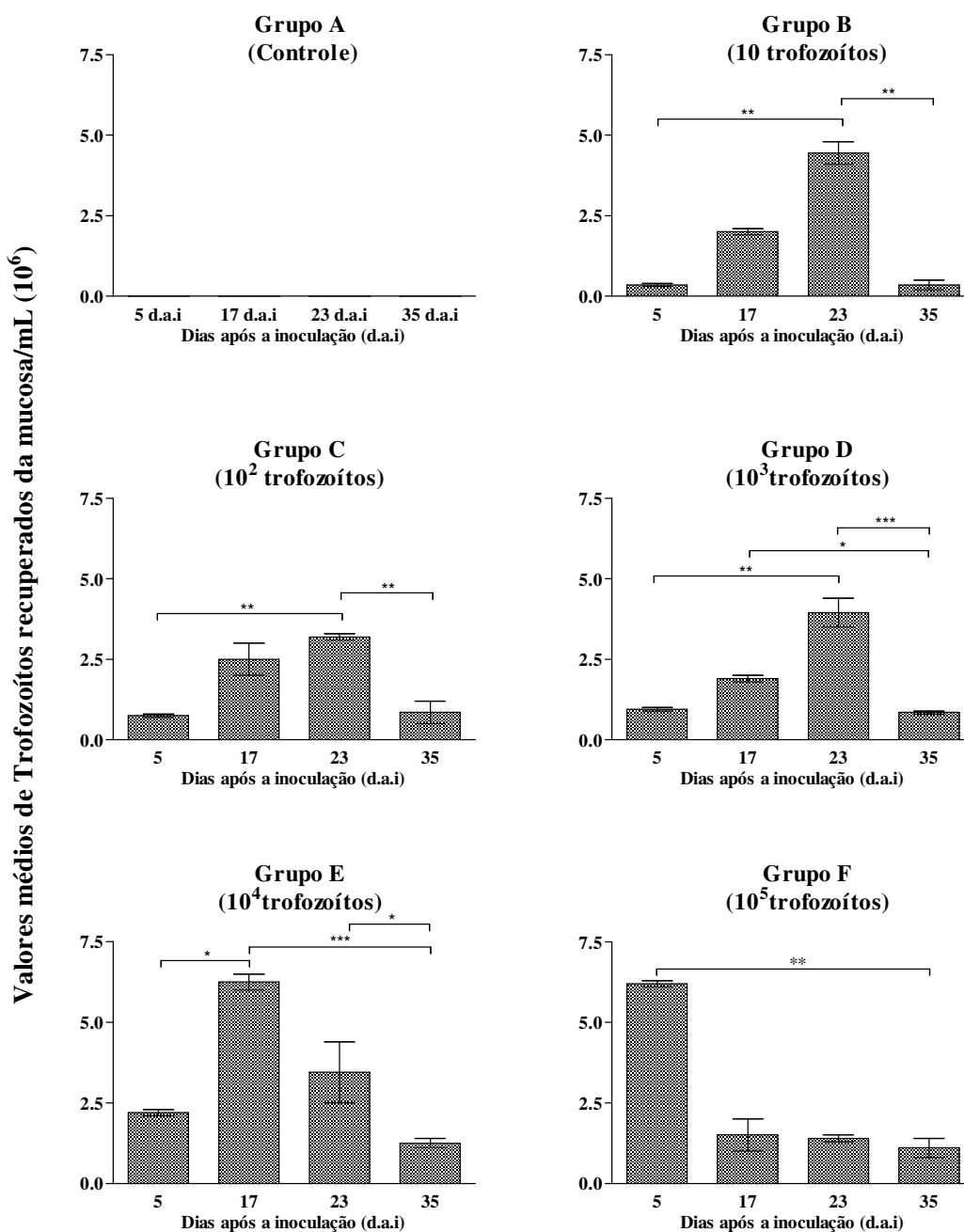


Figura 3: Valores médios de trofozoítos de *Giardia duodenalis* por grupo, recuperados da mucosa intestinal de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1. * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (Valores expressos em Média $\pm$ EP).

($6,25 \times 10^6$ trofozoítos/mL) foi estatisticamente superior aos grupos D e F com $p < 0,05$ para ambos. No 23º d.a.i. o maior número de trofozoítos foi recuperado nos animais do grupo B ($4,45 \times 10^6$ trofozoítos/mL), sendo este número estatisticamente superior ao grupo F ($p < 0,01$). O grupo E no 35º d.a.i, obteve a recuperação do maior número de trofozoítos diretamente da mucosa ($3,45 \times 10^6$ trofozoítos/mL), sendo este estatisticamente superior ao recuperado da mucosa dos animais do grupo B com $p < 0,05$ (Figura 4).

Correlacionando-se o número médio total de trofozoítos recuperados da mucosa dos animais, durante todo o experimento, com a dose de inóculo utilizada em cada grupo, foi observada a presença de correlação positiva com índice de correlação de spearman de 0,9429.

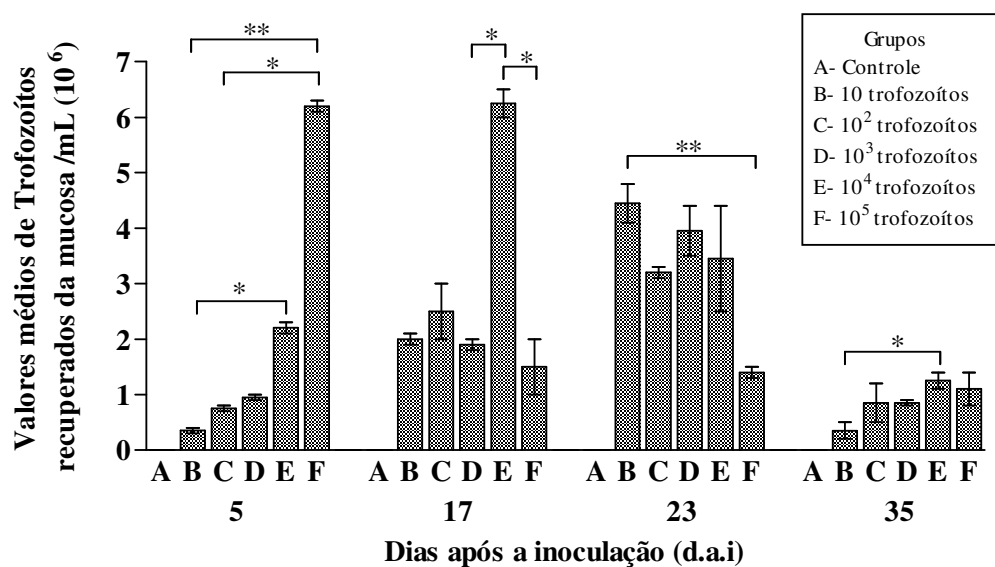


Figura 4: Análise conjunta por dia de sacrifício, dos valores médios de trofozoítos de *Giardia duodenalis* por grupo, recuperados da mucosa intestinal de gerbils (*Meriones unguiculatus*) inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1. * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (Valores expressos em Média $\pm$ EP).

5.3 Análise morfométrica

A análise morfométrica da mucosa intestinal, demonstrou a existência de queda no valor da razão vilon/cripta nos grupos inoculados, em relação ao grupo controle.

No 5º d.a.i os animais pertencentes ao grupo E apresentaram redução significativa ($p<0,01$) na razão vilon/cripta obtendo, em média, relação de 2:1, (Figura 5B) enquanto nos animais do grupo controle foi de 6:1 (Figura 5A). Nos grupos B e C a redução foi observada a partir do 17º d.a.i. com razão média de 4:1 para ambos ($p<0,01$; $p<0,05$ respectivamente) (Figuras 5C e 5D) e para os animais do grupo F (razão 4:1), no 23º d.a.i ($p<0,01$) (Figura 5E). Neste dia foi, também, observada redução acentuada, sendo esta significativa ($p<0,001$ para ambos) para os grupos B (3:1) e C (3:1). Nos grupos C e F foi observado, processo de recuperação significativo da mucosa no 35º d.a.i, quando a razão obtida nos animais destes grupos foi 5:1 (Figura 5F) e 4:1, respectivamente, embora estas continuem estatisticamente ($p<0,05$ e $p<0,01$) inferiores à obtida nos animais do grupo controle.

Analisando a altura das vilosidades, foi observado que, os animais pertencentes aos grupos C e E, apresentaram redução média significativa de 20 e 45% ($p<0,05$ e $p<0,001$ respectivamente) no tamanho da vilosidade, em relação ao grupo A (controle) no 5º d.a.i.. Nos animais dos grupos D e F a redução média foi de 38% e 14% ($p<0,001$ e $p<0,05$), respectivamente, no 17º d.a.i. e de 18% e 25% nos animais dos grupos B e C no 23º d.a.i. ($p<0,001$), respectivamente, para ambos os grupos.

Foi observado, também, o fenômeno de hiperplasia nas criptas dos animais pertencentes aos grupos inoculados. Os animais do grupo E apresentaram aumento médio significativo de 47% ($p<0,01$) no 5º d.a.i.. Nos grupos B e C, esse acréscimo foi

em média de 74% e 53% ($p<0,001$ e $p<0,05$), respectivamente, no 17º d.a.i e nos animais do grupo F, de 52% no 35º d.a.i. (Tabela 1).

Correlacionando a alteração na razão vílon/crípta com as variáveis avaliadas neste estudo, observou-se a existência de correlação inversa ($r_s = -0,9429$) entre o número de cistos eliminados e a razão vílon/crípta obtida morfometricamente.

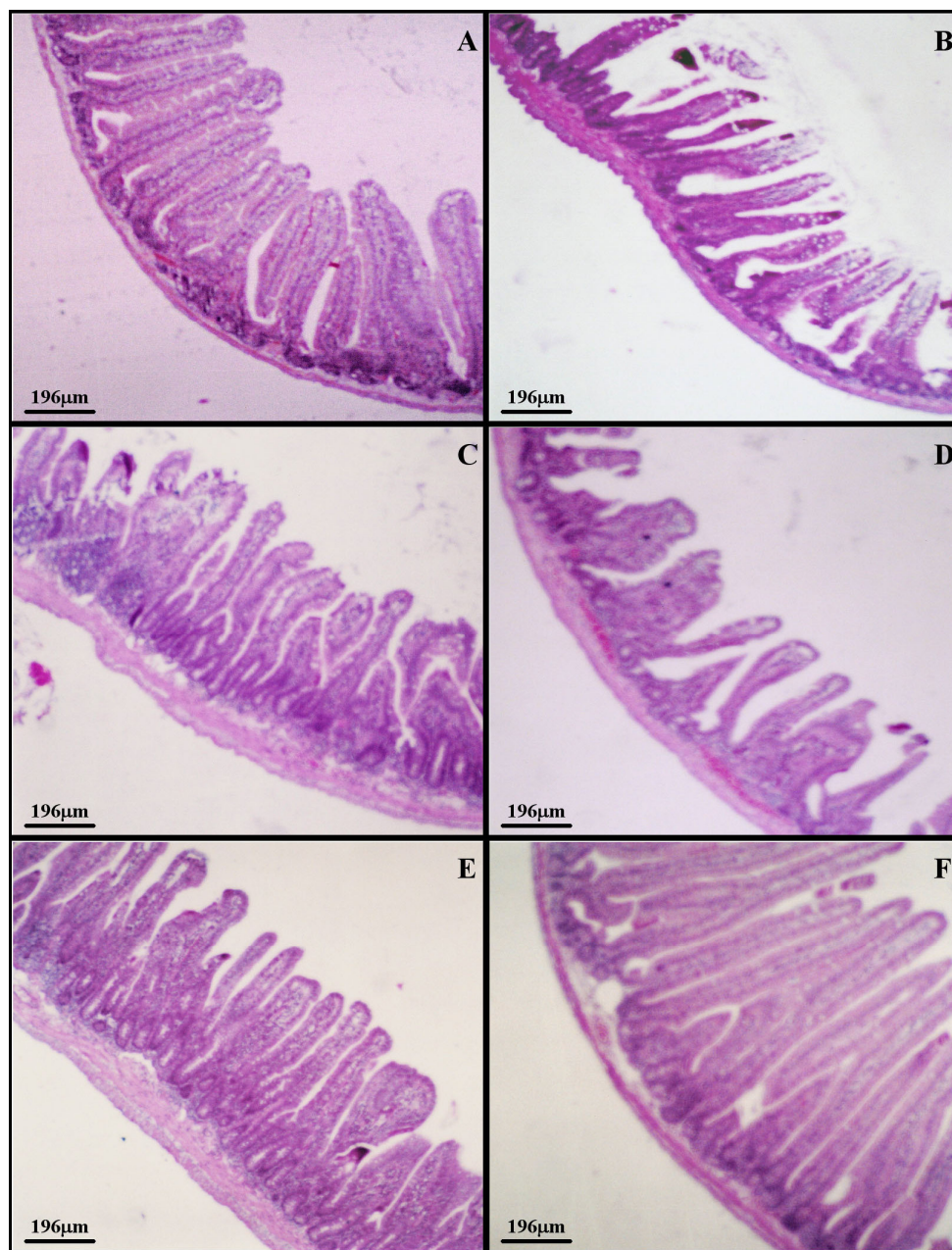


Figura 5: Fotomicrografias ópticas (10x) de biópsias intestinais (HE) de gerbils (*Meriones unguiculatus*), do grupo controle e inoculados experimentalmente com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland-1 de *Giardia duodenalis*. **A)** Grupo controle no 5º d.a.i, vilosidades digiformes, bem orientadas e pouco infiltradas, razão vílon/cripta $\cong$ 6:1. **B)** Grupo E no 5º d.a.i, vilosidades reduzidas, vacuolizações apicais e criptas infiltradas, razão vílon/cripta $\cong$ 2:1. **C)** Grupo B no 17º d.a.i, vilosidades reduzidas, criptas infiltradas, razão vílon/cripta $\cong$ 4:1. **D)** Grupo C no 17º d.a.i, vilosidades reduzidas, infiltradas, edemaciadas e em menor densidade, razão vílon/cripta $\cong$ 4:1. **E)** Grupo F no 23º d.a.i, vilosidades infiltradas, criptas hipertrofiadas, razão vílon/cripta $\cong$ 3:1. **F)** Grupo C no 35º d.a.i, observa-se processo de recuperação da mucosa em relação ao 17º d.a.i, razão vílon/cripta $\cong$ 5:1.

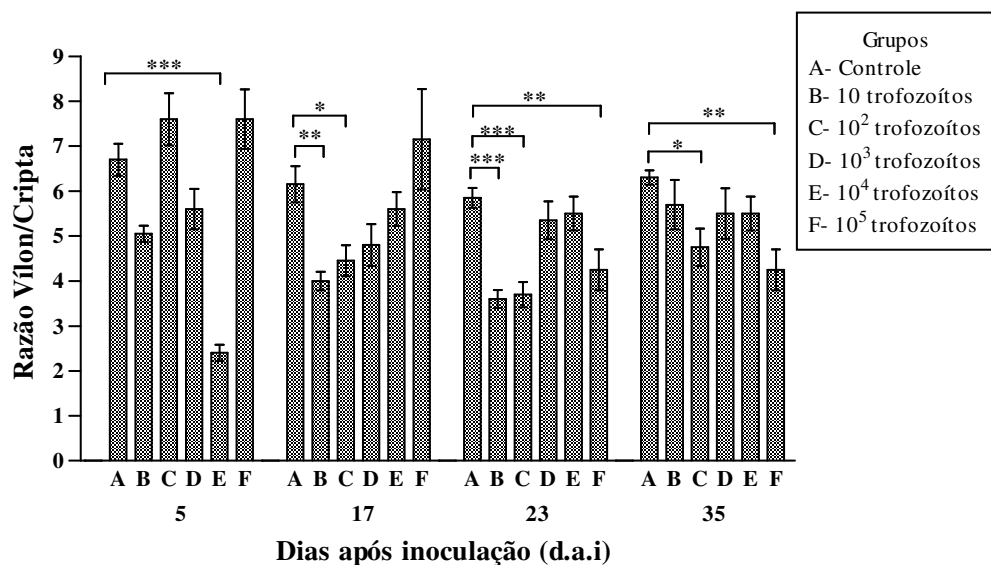


Figura 6: Valores médios da razão vilon/crípta do intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*), dos grupos controle (A) e inoculados experimentalmente (B, C, D, E, F), com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1 *Giardia duodenalis*, analisados nos quatro dias de sacrifício. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (Valores expressos em Média $\pm$ EP).

Tabela 1: Comparação entre a análise morfométrica das vilosidades e criptas do intestino delgado de gerbils (*Meriones unguiculatus*) dos grupos controle (A) e inoculados experimentalmente (B, C, D, E, F) com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland- 1 de *Giardia duodenalis* nos quatro dias de sacrifício.

ANÁLISE MORFOMÉTRICA					
D.a.i.	Grupos	Tamanho médio das vilosidades (µm)	Variação média em relação ao grupo controle (%)	Tamanho médio das criptas (µm)	Variação média em relação ao grupo controle (%)
5	A	646	0	101	0
	B	551	-13	111	+12
	C	514	-20**	74	-24
	D	602	-6	117	+21
	E	354	-45***	148	+47**
	F	730	-14	110	+13
17	A	771	0	130	0
	B	824	+8	214	+74***
	C	792	+3	191	+53*
	D	468	-38***	110	-10
	E	736	-4	144	+18
	F	664	-14*	125	+5
23	A	794	0	140	0
	B	632	-18***	190	+38
	C	591	-25***	171	+24
	D	636	-19***	131	-6
	E	655	-16**	131	-4
	F	728	-8	202	+46
35	A	840	0	135	0
	B	796	-5	161	+21
	C	799	-5	180	+35
	D	850	+1	173	+31
	E	655	-22	131	-2
	F	728	-13	202	+52*

D.a.i: dias após a inoculação

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

5.4 Disposição dos trofozoítos na mucosa intestinal

Pela microscopia eletrônica de varredura observou-se aumento na quantidade de muco nos animais inoculados, independente do inóculo, até o 23° d.a.i (Figura 7B à 7D) com relação ao grupo controle (Figura 7A). Trofozoítos foram observados agrupados em nichos, no topo e na base dos vílons (Figura 7C à 7G). Foram observadas, também, marcas circulares no epitélio de alguns vílons, semelhantes à marcas resultantes do desprendimento dos discos de adesão dos trofozoítos (Figura 7H). No 35° d.a.i., não foram observadas, alterações na produção de muco ou presença de trofozoítos nos grupos inoculados (Figura 7I).