

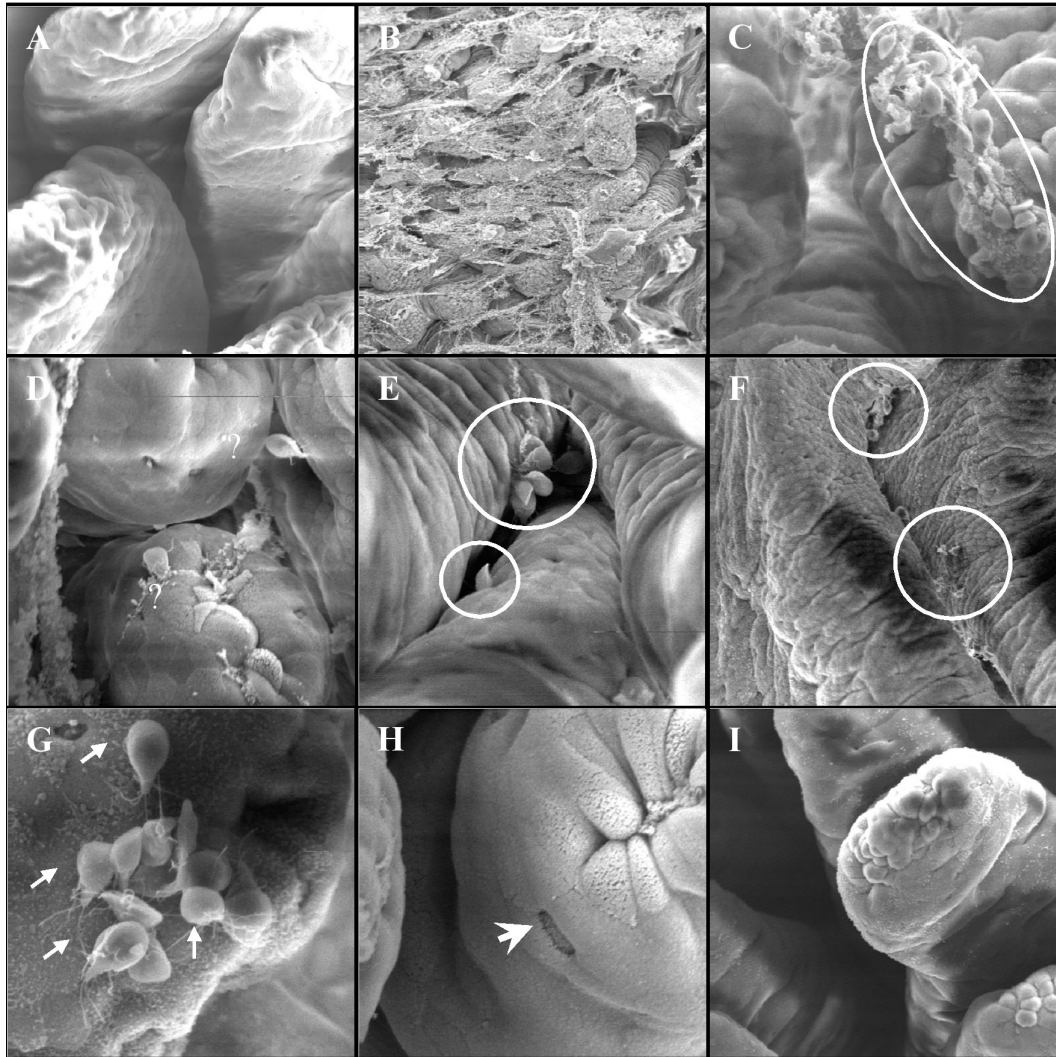


Figura. 7: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura de fragmentos intestinais de gerbils (*Meriones unguiculatus*), grupo controle e inoculados experimentalmente, com diferentes doses de trofozoítos do isolado humano Portland-1 de *Giardia duodenalis*. **A)** Grupo controle no 5º d.a.i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

Discussão

6. Discussão

A infecção por *Giardia duodenalis* é considerada grande problema de saúde pública devido a sua facilidade de transmissão e patologia (THOMPSON, 2000). Em humanos, pouco se sabe a respeito dos mecanismos patogênicos envolvidos nesta infecção, principalmente, devido à dificuldade em se realizar estudos controlados nestas populações (ASTIAZARÁN-GARCÍA et al., 2000). O uso de animais experimentais, principalmente gerbils (*Meriones unguiculatus*), para o estudo do desenvolvimento desta infecção, tem sido amplamente preconizado (BELOSEVIC et al., 1983; BURET; GALL; OLSON, 1991; BURET et al., 1992; MOHAMED; FAUBERT, 1995).

O período pré-patente e a cinética da infecção, observada neste estudo, corroboram com o obtido por outros autores que realizaram inoculações com trofozoítos do isolado Portland-1 ou de outros, onde relataram período pré-patente entre 9 e 12 d.a.i. e eliminação de cistos de forma intermitente e em quantidade irregular, até o 30° d.a.i. (BELOSEVIC et al., 1983; AGGARWAL; NASH, 1987; ASTIAZARÁN-GARCÍA et al., 2000). Belosevic et al (1983), utilizando como inóculo 5×10^3 trofozoítos do isolado Portland-1 de *Giardia duodenalis*, observaram período pré-patente entre 9 e 12 d.a.i, com pico de eliminação na 4ª semana após a inoculação, ritmo de eliminação intermitente até o 30° d.a.i., com maior número de trofozoítos recuperados da mucosa ($6,36 \times 10^6$) no 15° d.a.i.

Diferente do observado por Buret; Gall; Olson (1991) que observaram eliminação dos primeiros cistos no 6° d.a.i, com pico de recuperação de trofozoítos nos dias 4 e 6 após a inoculação com inóculo 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 à fatores do hospedeiro. Scott et al. (2000) trabalhando com ratos imunodeficientes, observaram maior infecção e maior eliminação de cistos, quando comparado aos animais imunocompetentes, podendo associar o grau de infecção com as condições imunológicas do hospedeiro.

Neste estudo, os animais do grupo B, inoculados com 10 trofozoítos, apresentaram alterações histopatológicas e recuperação de trofozoítos da mucosa intestinal, com valores semelhantes aos obtidos dos animais inoculados com maiores doses de trofozoítos. Roxström-Lindquist et al., 2006 comenta que a amplificação celular da *Giardia* ocorrida entre o estágio de excizoíto (16N) dando origem à quatro trofozoítos (4N) pode explicar, parcialmente, a presença de infecções com menores doses de inóculo. Além disso, a intensidade da infecção pode estar mais relacionada às condições individuais do que à dose de inóculo (ECKMAN, 2003).

As alterações na arquitetura da mucosa intestinal dos animais experimentais, tais como, redução na altura das vilosidades e hiperplasia das criptas aqui observadas, também foram relatadas em outros estudos. Inoculando 2×10^5 trofozoítos de *Giardia duodenalis* em gerbils, Buret et al., (1992) observaram uma redução significativa na altura das vilosidades associada a hiperplasia das criptas. Leitch et al. (1993) inoculando experimentalmente 10^3 cistos em gerbils, observaram hipertrofia significativa nas criptas duodenais dos animais inoculados em relação ao grupo controle. Em 1997, Hardin et al. Inocularam, experimentalmente, 2×10^5 trofozoítos em gerbils e observaram no 6º d.a.i., aumento na altura do vilon e da cripta. Ridley e Ridley (1976) estudando a patologia de 38 casos de infecção natural por *Giardia*

duodenalis através de biópsias intestinais, encontraram em 20 pacientes a razão vilon/cripta de aproximadamente $2^{1/2}$:1, obtida por aumento na altura das criptas, enquanto a razão em indivíduos não parasitados é de aproximadamente 5:1. Poley e Rosenfield (1982) observaram presença de hiperplasia focal no intestino de duas crianças naturalmente infectadas, pela ingestão de água contaminada com cistos de *Giardia*. Em 1997, Oberhuber, Kastner e Stolte encontraram em 4% dos pacientes, com biópsias positivas para *Giardia duodenalis*, redução na altura das vilosidades, associada ao aumento moderado no número de linfócitos intraepiteliais e infiltração da lâmina própria por granulócitos, linfócitos e plasmócitos.

Outros estudos realizados em humanos preconizam, no entanto, a inexistência de qualquer alteração histopatológica que pudesse ser identificada por microscopia de luz ou eletrônica (BARBIERI et al., 1970; TEWARI; TANDON, 1974; ERLANDSEN; CHASE, 1974; KLIMA et al., 1977; DUCOMB et. al., 1978). Deve-se ressaltar que os isolados utilizados pelos pesquisadores acima citados, foram diferentes do isolado Portland-1 utilizado neste estudo. Eckman (2003) relata que, a existência de diferenças genotípicas e fenotípicas entre os diferentes isolados podem influenciar na virulência dos isolados, tanto em infecções naturais quanto experimentais. No entanto, os resultados obtidos neste estudo com a utilização do isolado Portland-1, ficaram bem próximos aos obtidos pelos autores com a utilização de outros isolados.

O processo de adesão do parasito à mucosa intestinal e conseqüentemente o desencadeamento da resposta imunológica, têm sido considerados como principais causas do dano à mucosa (PEGADO; SOUZA, 1994; KATELARIS; NAEEM; FARTING, 1995; CÉU-SOUZA et al., 2001). Os trofozoítos aderidos à mucosa são

capazes de aumentar a permeabilidade de células epiteliais não-transformadas, através do rompimento das junções íntimas presentes entre elas (BURET et al., 2002). Este aumento na permeabilidade, pode ser devido à rearranjos no citoesqueleto destas células (TEOH et al., 2000), como resultado de clivagem Caspase-mediada das proteínas formadoras do citoesqueleto (CHIN et al., 2002).

O processo inflamatório da mucosa, desencadeado pela ação de antígenos de excreção e secreção, também, tem sido incriminado como causa do dano à mucosa na giardíase, como observado por Jiménez et al., (2004). Mediante a inoculação desses antígenos em camundongos Balb/c, estes autores observaram que, cisteino-proteínases presentes nestes antígenos de excreção e secreção, são capazes de causar danos à mucosa intestinal, assim como, ocorre na amebíase (ZHANG et al. 2000).

As alterações histológicas observadas neste estudo podem indicar que a redução na razão vilon/crípta possa ser resultante, principalmente, do fenômeno de hiperplasia observada nas criptas durante a infecção.

A análise dos dados obtidos dos animais pertencentes ao grupo D, sustenta esta hipótese. Neste grupo não pode ser observada, diferença significativa entre a razão vilon/crípta, sendo observado apenas, redução significativa média de 38% na altura das vilosidades em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Leitch et al., (1993) encontrando resultados semelhantes, cogitaram que a ausência de alterações significativas, em alguns animais, poderia ser justificada pelo comprimento considerável das vilosidades em gerbils, o que poderia mascarar possíveis diferenças significativas. Uma outra possível explicação para a ausência de diferenças significativas em alguns animais, pode estar relacionada na ação profilática que a flora

intestinal normal pode desenvolver contra infecções. Experimentos de co-cultivo de células epiteliais intestinais com lactobacilos comensais e trofozoítos de *Giardia* sp., têm resultado em inibição da proliferação deste parasito (PEREZ et al. 2001). Singer e Nash (2000) inoculando experimentalmente em duas linhagens de camundongos isogênicos, obtidas de diferentes fontes comerciais, observaram diferentes intensidades de infecções nestes animais. El-Shewy e Eid (2005) propuseram mecanismo de ação para este processo de proteção pela flora entérica, considerando que, trofozoítos podem incorporar bactérias endossimbiontes e após esta incorporação os trofozoítos seriam capazes de estimular a degranulação de células de Paneth, liberando proteases como as defensinas, que promoveriam a lise dos trofozoítos próximos a estas células.

A existência de correlação inversa entre o número médio de cistos eliminados e a redução na razão vílon/cripta, pode ser explicada pela recuperação da mucosa ocorrida após a eliminação de maior quantidade de cistos, comprovado pela morfometria.

Neste estudo, observou-se colonização intestinal sob a forma de nichos e não em forma de “atapetamento”, como citado por Barbieri et al. (1970) e Hall (1994), além de grandes áreas livres de trofozoítos e aumento na produção de muco. Estes achados foram semelhantes aos de outros autores, em trabalhos com infecções naturais e experimentais (TAKANO; YARDLEY, 1965; POLEY; ROSENFELD, 1982; LEITCH et al, 1989; ASTIAZARÁN-GARCÍA et al.; 2000). O maior número de nichos de colonização intestinal por trofozoítos, foi observado nos dias em que a maior quantidade de trofozoítos foi recuperada da mucosa, em cada grupo, sugerindo possível relação entre estes dados.

A produção de muco tem papel importante na defesa do hospedeiro contra a giardíase. A presença de mucinas na luz intestinal tem sido relacionada à redução da capacidade de adesão do parasito ao epitélio intestinal (CEBRA, 1999). Este aumento na secreção de muco ocorre rapidamente em resposta à colonização intestinal por patógenos (MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003). A imersão do parasito em muco e sua conseqüente remoção via peristaltismo intestinal, pode influenciar na intensidade da infecção (WALKER; OWEN, 1990).

Conclusões

7. Conclusões

- O período pré-patente observado foi de 12 dias para todos os grupos inoculados;
- A eliminação de cistos manteve-se de forma intermitente e em quantidade variável até o 35º d.a.i;
- A dose de inóculo de trofozoítos não interferiu no período pé-patente e na cinética da infecção;
- Não foi observada correlação entre a dose de inóculo de trofozoítos e o número médio total de cistos eliminados por cada animal pertencente aos grupos inoculados;
- Ocorreu correlação positiva entre a dose de inóculo e o número de trofozoítos recuperados diretamente da mucosa dos animais inoculados;
- Não foi observada relação entre a dose de inóculo e o desenvolvimento de alterações histopatológicas no intestino delgado dos animais inoculados;
- Observou-se correlação inversa entre o número médio de cistos eliminados e a redução da razão vílon/crípta;
- Os trofozoítos colonizaram o intestino dos animais inoculados sob a forma de nichos, sendo esta colonização acompanhada por aumento na produção de muco.

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

ABE, N.; KIMATA, I.; ISEKI, M. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 65, n. 1, p. 29-33, 2003.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n. 3, p. 447-75, 2001.

AGGARWAL, A.; NASH, T. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 2, p. 325-332, 1987.

ASTIAZARÁN-GARCIA, H.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTAÑÓN G.; CHAVÉZ-MUNGUÍA, B.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 128-135, 2000.

BARBIERI, D.; DEBRITO, T.; HOSHINO, S.; NASCIMENTO, F. O. B.; MARTINS-CAMPOS, J. V.; QUARENTEI, G.; MARCONDES, E. Giardiasis in childhood. Absorption test and biochemistry, histochemistry, light and electron microscopy of jejunal mucosa. **Archives of Disease in Childhood**, v. 45, p. 466-472, 1970.

BEAL, C. B.; GRANT, R. G. L.; HUGHES, J. M. A new technique for sampling duodenal contents-demonstration of upper small-bowel pathogens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 19, p. 349-352, 1970.

BELOSEVIC, M.; FAUBERT, G. M.; MACLEAN, J. D. Dissaccharidase activity in the small intestine of gerbil (*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. **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**, v. 3, n. 1, p. 55 – 62, 2001.

BORDEAU, P. Les giardioses des carnivores. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 169, n. 5-6, p. 393-400, 1993.

BRANDBROG, L. L.; TANKERSLEY, C. B.; GOTTLIEB, S.; BARANCIK, M.; SARTOR, V. E. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. **Gastroenterology**, v. 52, n. 2, p. 143-150, 1967.

BUGG, R. J.; ROBERTSON, I. D.; ELLIOT, A. D.; THOMPSON, C. A. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth Western, Austrália. **Veterinary Journal**, v. 157, n. 3, p. 295-301, 1999.

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**, v. 125, p. 11-19, 2002.

BURET, A.; GALL, D. G.; OLSON, M. E. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology, and dissaccharidase activity. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 403-409, 1990.

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**, v. 77, p. 109-114, 1991.

BURET, A.; HARDIN, J. A.; OLSON, M. E.; GALL, G. Pathophysiology of the small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Gastroenterology**, v. 103, p. 506-513, 1992.

CEBRA, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1046-1051, 1999.

CÉU-SOUSA, M. C.; GONÇALVES, C. A.; BAIROS, V. A.; POIARES-DA-SILVA, J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells.

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 8, p. 258-265, 2001.

CHIN, A. C.; TEOH, D. A.; SCOTT, K. G.; MEDDINGS J. B., MACNAUGHTON; W. K., BURET, A. G. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3673-3680, 2002.

COBEA. Princípios Éticos na Experimentação Animal. Disponível em www.cobea.org.br . Acesso em: 08 de maio de 2004.

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.

COSTA, M. S. G; NUNES, M. P. O.; NUNES, J. F. L; SILVA, E. M. A. Prevalência de enteroparasitoses em Natal, rotina coproscópica da parasitologia clínica – UFRN: estudo em um decênio. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 103-107, 1992.

COSTA-CRUZ, J. M.; CARDOSO, M. L. G.; MARQUES, D. E. Intestinal Parasites in food handlers in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 191-196, 1995.

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

CURY, G. C.; SALLES, P. C. O.; REIS, M. C. W.; REGO, V. M.; ARDNT, A. W.; SOUZA FILHO, C. B. A.; MOREIRA, H. B.; ABREU, M. S.; LEITE, P. M. G. Prevalência da esquistossomose mansoni 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.

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.

DUCOMB, V. M.; BOLIN, T. D.; DAVIS, H. E.; CUMMINGS, S.G.; CROUCH, R.L. Histopathology in giardiasis: a correlation with diarrhea. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v. 8, p. 392-396, 1978.

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

EL-SHEWY, K. A.; EID, R. A. In vivo killing of *Giardia* trophozoites harbouring bacterial endosymbionts by intestinal Paneth cell: an ultrastructural study. **Parasitology**, v. 130, p. 269-274, 2005.

ERLANDSEN, S. L.; CHASE, D. G. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, p. 1277-1286, 1974.

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

FARTING, N. 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 microbiological Reviews**, Washington, v.12, 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 Parasitology**, 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 technics for the diagnosis of protozoan and helminths in feces. **Journal Parasitology**, v. 25, p.241-262, 1939.

FERGUSON, A.; McCLURE, J. P.; TOWNLEY, R. R. W. Intraepithelial lymphocyte counts in small intestinal biopsies from children with diarrhoea. **Acta Paediatrica Scandinavian**, v.65,p. 541-546,1976.

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

FLORENCIO, M. L. Q. Estudos de alguns aspectos epidemiológicos da giardíase em famílias da cidade de Pradópolis, São Paulo. **Jornal de Pediatria**, v.66,p. 83-91,1990.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 538-548, 1990.

GOTTSTEIN, B.; NASH, T. E. Antigenic variation in *Giardia lamblia*:infection of congenitally athymic and *scid* mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 3,p. 649-659, 1991.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I. L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, 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.; REYNOLDSON, J. A.; LYMBERY, A. J. (Ed). ***Giardia: from molecules to disease***, Cambridge: CAB International, Cap.17, p.251-280, 1994.

HARALABIDIS, S. T. Immunodiagnosis of giardiasis by ELISA and studies on cross-reactivity between the anti-*lamblia* antibodies and some heterologous parasitic antigens and fractions. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 78, p. 295-300, 1984.

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**, v. 83, n. 5, p. 908-912, 1997.

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

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.

HEYMANS, H. S. A.; ARONSON, D. C.; van HOOFT M. A. J. Giardiasis in childhood: an unnecessarily expensive diagnosis. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v.146, p. 401-403, 1987.

HILL, D. R. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. **Infectious Disease Clinical North. American.**, v.7, p. 503-525, 1993.

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

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.

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, n. 11, p. 152-160, 2004..

KATELARIS, P. H.; NAEEM, A.; FARTHING, M. J. G. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human cell line. **Gut**, v. 37, p. 512-518, 1995.

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**, v. 194, n. 4, p. 447-450, 1989.

KIRKPATRICK, C. E. Giardiasis. **Veterinaria Clinical of North American Small Animals. Practice**, v. 17, n. 6, p. 1377-1387, 1987.

KIRKPATRICK, C. E.; GRENN 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.

KLIMA, M.; GYORKEY, P.; MIN, K. W.; GYORKEY, F. Electron microscopy in the diagnosis of giardiasis. **Archives in Pathology and Laboratory Medicine**, v. 101, n. 3, p. 133-135, 1977.

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

LAMBL, W. Mickroskopische Untersuchungen der Darm-Excrete. **Vierteljahrtsschrift für die praltisch Heikunde**, Praga, v. 61, p. 1-58, 1859.

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

LEITCH, G. J.; VISVESVARA, G. S.; WAHLQUIST, S. P.; HARMON, C. T. Dietary fiber and giardiasis: dietary fiber reduces rate of intestinal infection by *Giardia lamblia* in the gerbil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 179-182, 1989.

LEITCH, G. L.; UDEZULU, I. A.; HE, Q.; VISVESVARA, G.S. Effects of protein Malnutrition of Experimental Giardiasis in the Mongolian Gerbil. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 10, p. 855-893, 1993.

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

MACHADO, R. L. D.; FIGUEIREDO, M. C.; FRADE, A. F.; KUDÓ, M. E.; SILVA FILHO, M. G.; PÓVOA, M. M. Comparação de quatro métodos laboratoriais para o diagnóstico de *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Bélem, Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 91-93, 2001.

MARTI, M.; REGOS, A.; LI, Y.; SCHRANER, E. M.; WILD, P.; MÜLER, N.; KNOPF, L. G.; HEHL, A. B. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 24.837-24.848, 2003.

MEYER, E. A.; RADULESCU, S. *Giardia* and Giardiasis. **Advances In Parasitology**, London, v. 17, p. 1-47, 1979.

MOHAMED, S. R.; FAUBERT, G. M. Disaccharidase deficiencies in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) protected against *Giardia lamblia*. **Parasitology Research** v.81, p. 582-590, 1995.

MONCADA, D. M.; KAMMANADIMINTI, S. J.; CHADEE, K. Mucin and Toll-like receptors in host defence against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 305-311, 2003.

MONIS, P. T.; THOMPSON, R. C. A. Cryptosporidium and Giardia – zoonoses: fact or fiction. **Inf. Gen. Evol.**, v. 3, p. 233-244, 2003.

NEWMAN, R. D.; MOORE, S. R.; LIMA, A. A. M.; NATARRO, J. P.; GUERRANT, R. S.; SEARS, C. L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian Children. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 621-634, 2001.

NUNES, M. P. O.; COSTA, M. S. G.; NUNES, J. F. L.; SILVA, E. M. A.; DANTAS, M. F. A. Avaliação do método de Faust e cols., de Hoffman e cols, de Baermann modificado, utilizados na rotina sistemática, para o diagnóstico das enteroparasitoses. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 25-26, 1993.

OBERHUBER, G.; KASTER, N.; STOLTE, M. Giardiasis: A histologic analysis of 567 cases. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, p. 48-51, 1997.

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

PEGADO, M. G.; DE SOUZA, W. Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells in vitro. **Parasitology Research**, v. 80, p. 320-326, 1994.

PEREZ, P. F.; MINNARD, J.; ROUVET, M.; KNABENHANS, C.; BRASSART, D.; DE ANTONI, G. L.; SCHIFFRIN, E. J. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an in vitro study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5037- 5042, 2001.

POLEY, J. R.; ROSENFELD, S. Malabsorption in giardiasis: Presence of luminal barrier (mucoid pseudomembrane). A Scanning and transmission electron microscopy study. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 63-80, 1982.

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.; STEVENS, D. P.; MAHMOUD, A. A.; WARREN, K. S. Giardiasis in the mouse: an animal model. **Gastroenterology**, v. 71, n. 1, p. 57-61, 1976.

ROCHA, M. O.; PIRES, E. M.; SILVA, M. E. V.; NOGUEIRA, E. S.; FLAUZINA, A. P. Prevalência de parasitas intestinais em uma amostra da população do Bairro Lindéia- Belo Horizonte, Brasil. **Revista de Farmácia e Bioquímica da UFMG**, Belo Horizonte, v. 5, n. 2, p. 107-112, 1983.

ROSOFF, J. D.; SANDERS, C. A.; SONNAD, S. S.; LAY, P. R. D.; HADLEY, W. K.; VICENZI, F. F.; YAJKO, D. M.; O'HANLEY, P. D. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available Enzyme Immunoassay to detect *Giardia* specific Antigen 65 (GSA 65). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p. 1997-2002, 1989.

ROSOFF, J. D.; STIBBS, H. H. Isolation and identification of *Giardia lamblia* specific stool antigen (GSA 65) usefull in coprodiagnosis of giardiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, p. 905-910, 1986.

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

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.

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., LOGAN, M.R., KLAMMER, G.M., TEOH, D.A., BURET, A.G. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T-lymphocytes and interleukin-6. **Infections and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3412-3418, 2000.

SCOTT, K. G.; YU, L. C.; BURET, A. G. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. **Infections and Immunity**, v. 72, p. 3536-3542, 2004.

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. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 65, p. 3944-3946, 2000.

SMITH, P. D.; GILLIN, F. D.; BROWN, W. R.; NASH, T.E. IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme- linked immunoabsorbent assay. **Gastroenterology**, New York, v. 80, p. 1476-1480, 1981.

STIBBS, H. H.; SAMADPOUR, M.; MANNING, J. F. Enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* cysts antigens in formalin-fixed and unfixed human stool. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p. 1655-1669, 1988.

SUZUKI, H. U.; de MORAIS ,M. B.; MEDEIROS, E. H.; do CORRAL, J. N.; FAGUNDES-NETO, V. Diagnostic limitaions of the isolation of *Giardia lamblia* in duodenal aspirates. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 31, p. 69-74,1994.

TAKANO, J.; YARDLEY, J. G. Jejunal lesions in patients with giardiasis and malabsorption. An electron microscopic study . **Bulletin of Johns Hopkins Hospital**, v. 116, p. 413-429, 1965.

TEOH, D. A.; KAMIENIECKI, D.; PANG, G.; BURET, A. G. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces trasepithelial electrical resistance. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 800-806, 2000.

TEWARI, S. G.; TANDON, B. N. Functional and histological changes of small bowel in patients with *Giardia lamblia* infestation. **Indian Journal of Medicine Research**, v.62, n. 5, p. 689-695, 1974.

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

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

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

THOMPSON, R. C. A.; MORGAN, U. M.; MELLOR, K. J. HOPKINS, R. M. Genotyping *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Today's Life Science**, v. 11, p. 80-86, 1999.

THOMPSON, R. C. A. *Giardia* infections. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E. J. L.; SIMPSON, D. I. H. (Eds.), *Zoonoses: Biology, Clinical Practice and Public Health Control*. **Oxford University Press**, p.545-561, 1998.

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

THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; MELONI, B. P. Genetic Variation in *Giardia* Kunstler, 1882 taxonomic and epidemiological significance. **Protozoological Abstracts**, Farnham Royal, v. 14, p.1-28, 1990.

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.

vanKEULEN, H.; MACECHKO, P. T.; WADE, S.; SCHAOFF, S.; WALLIS , P. M.; ERLANDSEN, S. L. Presence of human *Giardia* in domestic, farm, and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potencial for giardiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 97-107, 2002.

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

VISVESVARA, G. S.; DICKERSON, J. W.; HEALY, G. R. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 5, p. 837-841, 1988.

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**, Philadelphia, v. 93, p. 802-805, 1980.

WALKER, R. I.; OWEN, R. L. Intestinal barriers to bacteria and their toxins. **Annual Review of Medicine**, v. 41, p. 393-400, 1990.

WITTNER, M.; MAAYAN, S.; FARRER, W.; TANOWITZ, H. B. Diagnosis of giardiasis by two methods: immunofluorescence and enzyme-linked immunoabsorbent assay. **Archives of Pathology Laboratory and Medicine**, Chicago, v. 107, p. 524-527, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Parasitic zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Technical Report Series, n. 637, 1979.

WOLFE, M. S. Giardiasis (Review). **Microbiological Review**, Washington, v.5, p. 93-100, 1992.

WU, Y. H.; WANG, Z. Y.; LU, S. Q.; JI, A. P.; ZHANG, C. H. Further studies on the mongolian jird of *Giardia lamblia*. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v.7, n. 3, p. 187-190, 1989.

YOLKEN, R. H.; UNGAR, B. Elisa detection of *Giardia lamblia*. **Lancet**, London, v. 2, p. 120, 1985.

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**, v. 38, p. 221-224, 2002.

ZAJAC, A. M.; LABRANCHE, T. P.; DONOGHUE, A. R.; CHU, T. C. Efficacy of febendazole in the treatment of experimental *Giardia* infections in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 61-63, 1999.

ZHANG, Z.; WANG, L.; SEYDEL, K. B.; LI, S.; ANKRI, S.; MIRELMAN, D.; STANLEY JR., S. L. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 542-548, 2000.

Anexos

Anexo A- Soluções**Meio de Cultura para *G. duodenalis*- TYI-S- 33 modificado**

Tripticase	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Glicose	5,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	1,0 g
Fosfato bi-ácido de Potássio (KH_2PO_4)	0,5 g
Fosfato monoácido de Potássio (K_2HPO_4)	0,3 g
L- Cisteína	1,0 g
Ácido Ascórbico	0,1 g
Citrato Férrico II	0,011 g
Bile Bovina	0,3 g
Água destilada q.s.p.	450 mL

- Acrescentar:

50 mL de soro bovino, inativado à 56°C durante 30 minutos;

Penicilina G potássica: 200 UI/mL de meio de cultura;

Streptomicina 100 µg/ mL de meio de cultura.

- Filtrar em filtro tipo Seitz e distribuir em tubos de ensaio de boca rosqueada.

Solução Salina Fosfatada (PBS)

Cloreto de Sódio (NaCl)	8,0 g
Fosfato bi-básico de Sódio (Na ₂ HPO ₄)	1,15 g
Fosfato bi-ácido de Potássio (KH ₂ PO ₄)	0,20 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,20 g
Água bi-destilada	1000 mL

Solução de Sulfato de Zinco 33% d= 1.180

Sulfato de Zinco (ZnSO ₄)	33 g
Água destilada	100 mL

- Mexer vigorosamente até a diluição completa do sal;
- Filtrar em algodão e manter a solução em frasco escuro.

Solução de Lugol

Iodo	1 g
Iodeto de Potássio (KI)	2 g
Água destilada	100 mL

- Mexer vigorosamente até a diluição completa do sal;
- Filtrar em algodão e manter a solução em frasco escuro.

Solução Sacarose 1 M

Sacarose	342,31 g
Água bi-destilada	1000,0 mL

Solução Sacarose 0,75 M

Sacarose	256,73 g
Água bi-destilada	1000,0 mL

Formol Tamponado com Fosfatos (10%)

Fosfato de Sódio Monobásico 7 H ₂ O (NaH ₂ PO ₄ * 7H ₂ O)	4,25 g
Fosfato de Sódio Bibásico (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O)	13,0 g
Formol Comercial (HCHO PM 30,03)	100,0 mL
Água destilada	900,0 mL

Tampão Cacodilato de Sódio 0,2M

Cacodilato de Sódio	4,28 g
Água destilada e deionizada	100,0 mL

- Mistura todos os ingredientes e regula pH para 7,2~7,4

Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M

Tampão Cacodilato 0,2M	25,0 mL
Ácido Clorídrico (HCl) 0,2 N	1,35 mL
Água destilada e deionizada	73,65 mL

- Mistura todos os ingredientes e regula pH para 7,2~7,4

Solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,2N

Ácido Clorídrico (HCl) comercial (concentrado 37%)	1,6 mL
--	--------

Água destilada e deionizada	98,4 mL
-----------------------------	---------

- Mistura em balão volumétrico metade do volume da água, adiciona-se o ácido e em seguida completa-se o volume de água

Solução de Sacarose (10%) em tampão Cacodilato de Sódio para armazenagem de cortes para Microscopia Eletrônica de Varredura

Sacarose PA	10 g
-------------	------

Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M	90,0 mL
---------------------------------	---------

Fixador de Karnovsky (120ml)

Paraformaldeído (16%)	15,3 mL
-----------------------	---------

Glutaraldeído (25%)	11,9 mL
---------------------	---------

Água destilada e deionizada	2,4 mL
-----------------------------	--------

Tampão Cacodilato de Sódio	90,4 mL
----------------------------	---------

Tetróxido de Ósmio (2%)

Ampola de Tetróxido de Ósmio	2,0 mL
------------------------------	--------

Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M	100,0 mL
---------------------------------	----------

- ATENÇÃO: Solução EXTREMAMENTE TÓXICA, manusear em capela, com a utilização de todos os equipamentos de proteção individual.