

MARCELO URBANO FERREIRA

Parasitologia

CONTEMPORÂNEA

2ª EDIÇÃO



Os Protozoários Intestinais Clássicos

Marcelo Urbano Ferreira ■ Annette Silva Foronda

Introdução

Os protozoários intestinais mais comuns em hospedeiros imunocompetentes, as amebas *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* e o flagelado *Giardia duodenalis* são o principal tema deste capítulo. Diversos outros protozoários podem ser eventualmente encontrados no trato digestório humano, incluindo aqueles considerados comensais (não patogênicos), os oportunistas (que causam doença somente em hospedeiros imunocomprometidos) e os emergentes (que foram recentemente caracterizados como causa de doença humana). Os parasitos intestinais emergentes são objeto do Capítulo 9, *Os Protozoários Intestinais Emergentes*.

Amebas intestinais e a amebíase

O termo *amebíase* refere-se ao parasitismo humano por *E. histolytica* e *E. dispar*, acompanhado ou não de manifestações clínicas. Embora durante quase um século *E. histolytica* tenha sido considerada uma única espécie, definem-se atualmente duas espécies morfologicamente idênticas, que diferem em características bioquímicas, imunológicas, genéticas e epidemiológicas, associadas à amebíase humana: *E. histolytica*, patogênica, e *E. dispar*, não patogênica. Quando o diagnóstico específico não for possível, recomenda-se referir-se ao protozoário como *E. histolytica/E. dispar*. A existência de duas espécies distintas explicaria, pelo menos em parte, a grande variedade de manifestações clínicas associadas à amebíase, como originalmente descrito por Émile Brumpt em 1925 (Diamond; Clark, 1993). Uma terceira espécie morfologicamente indistinguível de *E. histolytica/E. dispar*, originalmente isolada a partir de amostras colhidas na rede de esgotos da cidade de Moscou em 1941, também infecta o ser humano. Trata-se de *Entamoeba moshkovskii*, também descrita, em 1961, como a cepa Laredo de *E. histolytica*. Existem atualmente métodos moleculares que tornam possível o diagnóstico específico de infecções por *E. moshkovskii*. Entretanto, resta determinar a contribuição relativa dessa espécie, inicialmente descrita como um protozoário de vida livre, como causa de amebíase humana (Heredía et al., 2012). Uma das características marcantes de *E. moshkovskii* é sua capacidade de crescimento, *in vitro*, em temperaturas que variam entre 4°C e 40°C. Finalmente, a quarta espécie semelhante a *E. histolytica*, que recebeu o nome de *Entamoeba bangladeshi*, foi recentemente descrita em crianças de Daca, capital de Bangladesh. As primeiras análises filogenéticas mostram que *E. bangladeshi*

pertence ao mesmo clado que as demais *Entamoeba* que infectam seres humanos, e é mais próxima a *E. histolytica* que *E. dispar* e *E. moshkovskii* (Royer et al., 2012). Diversas espécies de *Entamoeba* infectam primatas não humanos, incluindo *E. hartmanni*, *E. dispar* e *E. nuttalli*, uma espécie frequentemente confundida com *E. histolytica* (Elsheikha et al., 2018).

Aspectos biológicos

O agente etiológico da amebíase foi descoberto em 1875, em São Petersburgo, pelo médico russo Fiodor Lesh. Em 1903, Fritz Schaudinn afirmou que *E. histolytica* era a única espécie de ameba patogênica para o ser humano, criando o nome específico definitivo. *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* são protozoários monoxenos situados, na classificação mais recente (Adl et al., 2005), no grupo Entamoebida do supergrupo Amoebozoa. Seu ciclo vital inclui três formas.

Os trofozoítos de *E. histolytica/E. dispar* são pleomórficos, de tamanho entre 15 e 20 µm, com um único núcleo e apresentando movimentação por pseudópodes, tipo lobópodes, e divisão assexuada por fissão binária simples. Embora não haja evidência de reprodução assexuada em *Entamoeba*, seu genoma contém genes que codificam diversas proteínas necessárias para a mitose em eucariotos. O núcleo, fora da mitose, apresenta um aglomerado de cromatina rico em DNA, conhecido como *cariossoma* ou *endossoma*, pequeno, compacto e localizado geralmente em sua porção central, ainda que possa ter posição ligeiramente excêntrica. A cromatina periférica, rica em RNA, é delicada, homogeneamente distribuída na periferia do núcleo (Figura 8.1). Estas são algumas das características morfológicas que possibilitam a diferenciação entre trofozoítos e cistos de *E. histolytica/E. dispar* e de outras amebas comensais que habitam o trato digestório humano, como *Entamoeba coli*, *E. hartmanni* e *E. polecki*. As formas invasivas de *E. histolytica/E. dispar* são grandes e, em geral, têm hemácias no citoplasma. Alimentam-se por emissão de pseudópodes, por processo de fagocitose. No citoplasma dos trofozoítos, observa-se frequentemente uma nítida separação entre o ectoplasma, de aspecto hialino, e o endoplasma, mais granuloso e geralmente corado de modo mais intenso (Figura 8.1 A,G).

Os *pré-cistos* são intermediários entre trofozoítos e cistos, com um núcleo (Figura 8.1B). Os *cistos* são esféricos ou ovais, com tamanho de 10 a 15 µm e parede cística rígida. Apresentam divisão múltipla por esquizogonia; podem conter um a quatro núcleos, que apresentam as mesmas características morfológicas descritas para os núcleos dos trofozoítos. Os *cistos* imaturos, isto é, aqueles com um ou dois núcleos, apresentam uma ou mais estruturas cilíndricas conhecidas

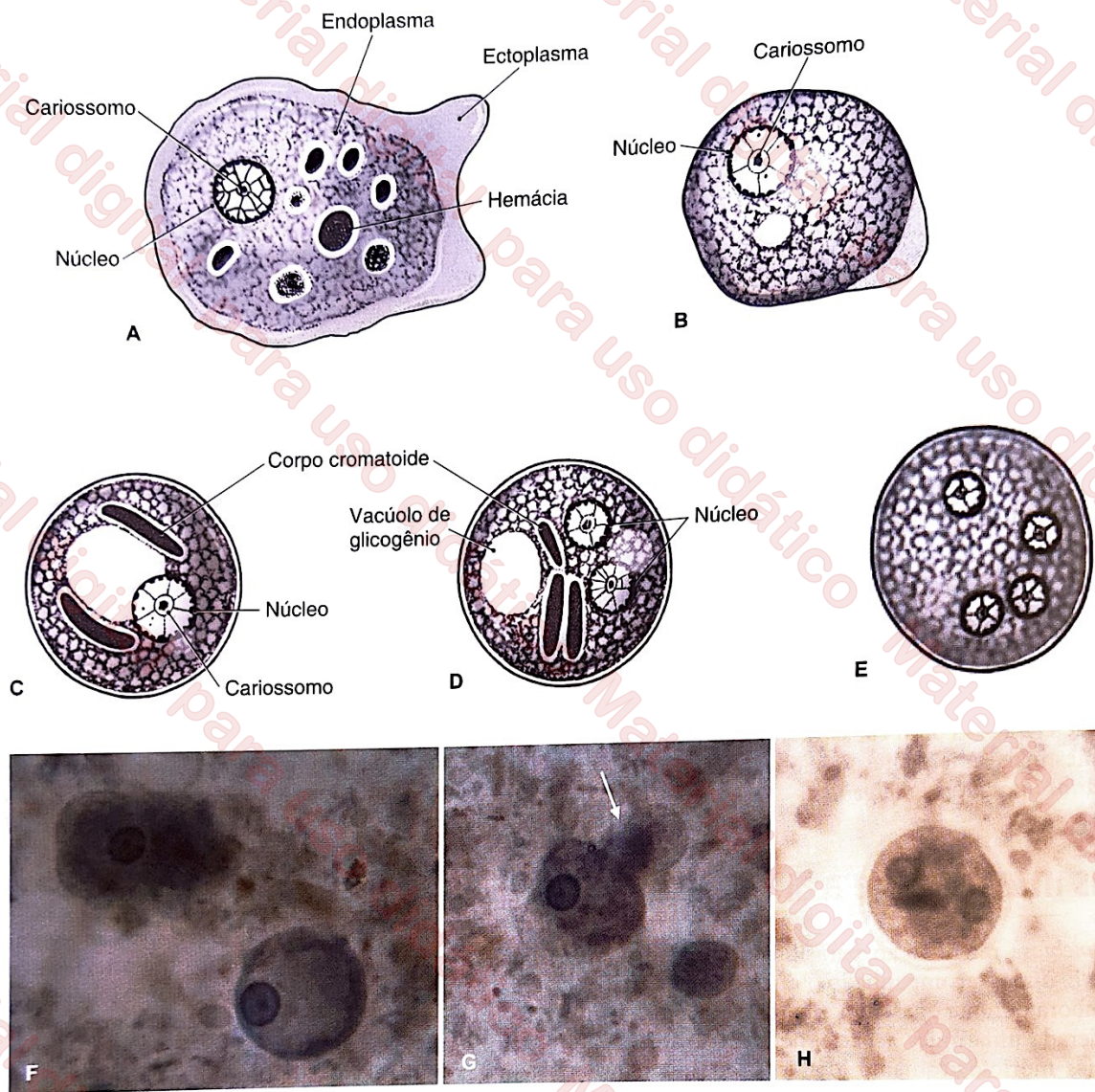


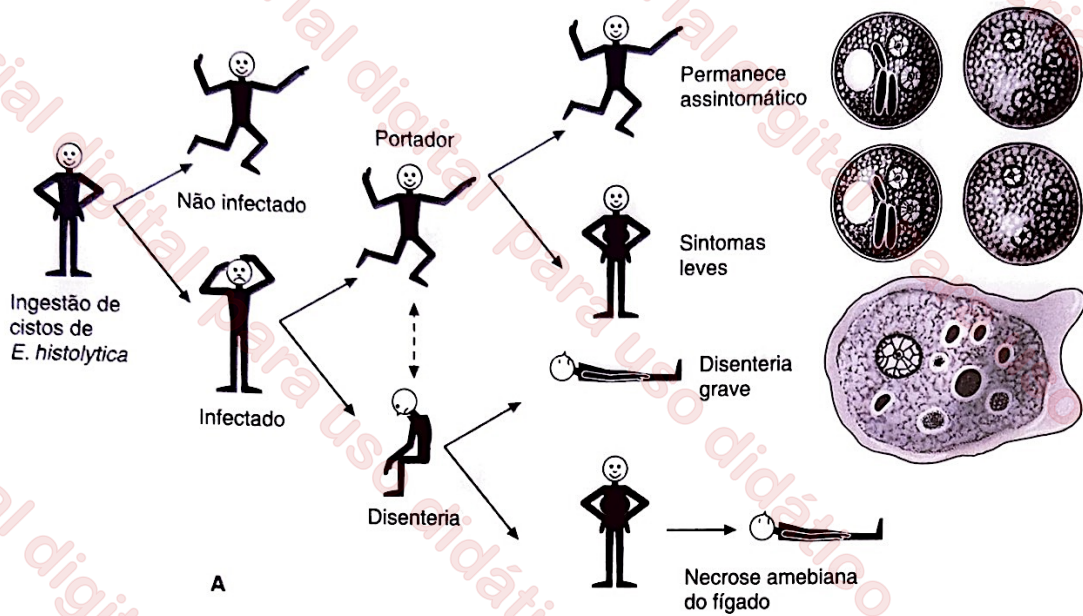
FIGURA 8.1 Estágios evolutivos de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*. Representação esquemática da morfologia do trofozoíto (A), pré-cistos (B) e cistos (C, D e E) de *E. histolytica*/*E. dispar*. Em F, observam-se um trofozoíto e um cisto uninucleado com vacúolo de glicogênio; em G, um trofozoíto emitindo pseudópode (*seta*), e em H, um cisto binucleado com corpo cromatoide de *E. histolytica*/*E. dispar*, em preparações coradas com hematoxilina férrica. Observa-se que o corpo cromatoide tem formato de charuto. Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

como *corpos cromatoides*, constituídas por agrupamentos de ribossomos, em forma de bastão ou charuto, com extremidades arredondadas (Figura 8.1 C, D, H). Têm também um ou mais *vacúolos de glicogênio*, que servem como reserva de energia para essa forma de resistência (Figura 8.1 C, D, F).

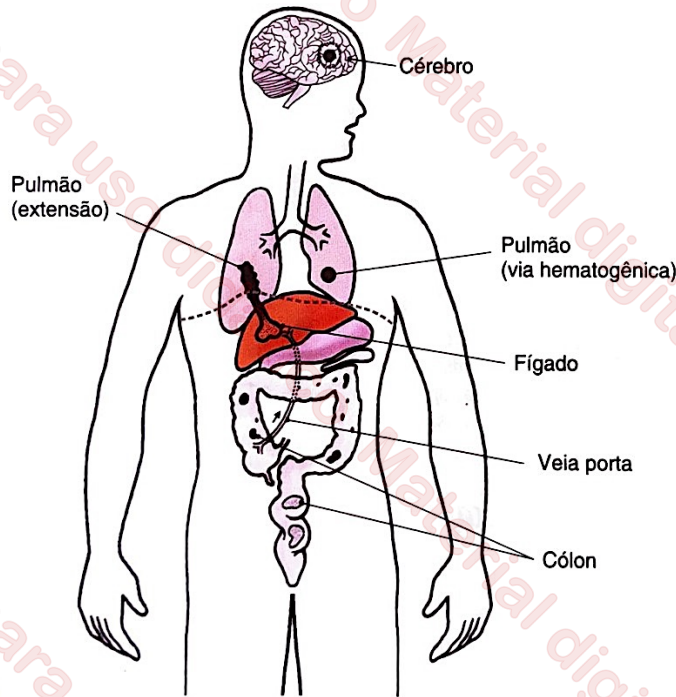
O hábitat de *E. histolytica* e *E. dispar* é o intestino grosso. Dos cistos maduros, quadrinucleados, são liberadas, nos últimos segmentos do intestino delgado ou na parte anterior do intestino grosso, formas chamadas de metacísticas. Após rápida divisão mitótica, transformam-se em oito *trofozoítos* que passam a colonizar o epitélio do intestino grosso. Os trofozoítos multiplicam-se de modo assexuado, por fissão binária simples. Se levados às últimas porções do intestino grosso, os trofozoítos progressivamente desenvolvem uma membrana cística, e são liberados para o meio exterior (Figura 8.2A). Contaminam a água e os alimentos, podendo então atingir outros hospedeiros. Os *cistos* são as únicas formas com condições de sobrevivência no ambiente externo. Os *cistos maduros*, com quatro

núcleos (Figura 8.1E), não apresentam vacúolos de glicogênio nem corpos cromatoides e são as formas responsáveis pela transmissão ao próximo hospedeiro. As formas invasivas ou trofozoítos penetram no epitélio intestinal e dividem-se intensamente na submucosa. Podem ser eventualmente eliminados nas fezes de pacientes com disenteria grave. Produzem ulcerações extensas e podem atingir outros órgãos por via hematogênica (Figura 8.2B). A transmissão do protozoário é orofecal (Figura 8.3), por contaminação de água e alimentos com cistos, dependendo de hábitos culturais, idade, saneamento básico, aglomeração populacional e nível socioeconômico.

Embora consideradas classicamente como anaeróbicas, essas amebas são microaerófilas, isto é, utilizam pequenas quantidades de oxigênio. Têm estrutura celular simples, com metabolismo semelhante ao das bactérias. Durante muitos anos, as amebas foram consideradas protozoários primitivos, especialmente por não apresentarem uma mitocôndria típica. Entretanto, as amebas têm uma pequena organela, chamada



A



B

FIGURA 8.2 Evolução das infecções por *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*, com representação dos estágios evolutivos eliminados em cada quadro clínico (A) e localização das lesões mais frequentes causadas por *E. histolytica* (B).

mitossoma (Tovar et al., 1999) ou *cripton* (Mai et al., 1999), que exerce várias funções típicas de mitocôndrias. Organelas semelhantes foram identificadas em *G. duodenalis* (Tovar et al., 2003) e em diversos microsporídeos. Provavelmente o mitossoma e as mitocôndrias têm um ancestral comum, mas, diferentemente destas, os mitossomas não contêm um genoma próprio. Os genes que codificam as proteínas de mitossomas estão no genoma nuclear das amebas. *Entamoeba* não apresenta um retículo endoplasmático rugoso e um complexo de Golgi típicos, mas é possível que algumas vesículas citoplasmáticas exerçam pelo menos parte de suas funções.

O genoma de *E. histolytica* (cepa HM1:IMSS) foi publicado e analisado em 2005 (Loftus et al., 2005), com nova montagem e anotação publicada logo a seguir (Lorenzi et al., 2010). Compreende quase 21 milhões de pares de bases de DNA, com aproximadamente 75% de adenosina (A) e timina (T) e 8.333 genes anotados. O genoma de *E. dispar* tem quase 23 milhões de pares de bases, com 76% de A e T e 8.749 genes anotados (Tawari et al., 2008). Não se sabe a ploidia de *Entamoeba*; com o uso de eletroforese em campo pulsado, foram identificados 14 cromossomos em *E. histolytica* (Willhoeft; Tannich, 1999).

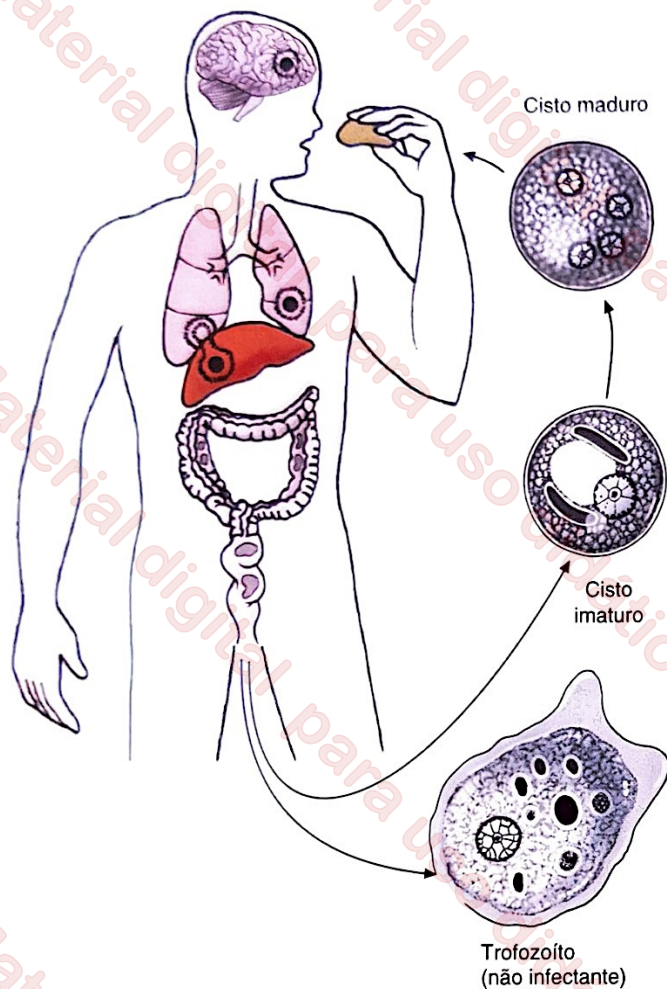


FIGURA 8.3 Ciclo vital de *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*. Observa-se que os trofozoítos eventualmente eliminados nas fezes diarreicas não são infectantes. As localizações mais comuns de acometimento intestinal e extraintestinal também são representadas.

Diferenças entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*

O consenso quanto à existência de duas espécies morfologicamente idênticas de amebas que infectam o ser humano foi estabelecido em uma reunião internacional de especialistas em 1997 (WHO, 1997). A diferenciação baseou-se inicialmente na caracterização do padrão de mobilidade de isoenzimas em eletroforese de diversos isolados de *E. histolytica* (Sargeunt et al., 1978). O padrão de migração de um grupo de isoenzimas constitui o chamado zimodema. Existem vários zimodemas conhecidos, uns associados a cepas invasivas (*E. histolytica*) e outros a cepas não invasivas (posteriormente definidas como *E. dispar*). Observaram-se também diferenças no padrão de crescimento de amebas pertencentes a zimodemas distintos em culturas axênicas. Em geral, o crescimento em cultura é facilmente obtido em *E. histolytica* mas não em *E. dispar*.

Embora as amebas patogênicas difiram das amebas não patogênicas quanto à sua capacidade de adesão às células-alvo e de produzir lesão da mucosa intestinal, os determinantes moleculares de padrões distintos de virulência não são completamente conhecidos. Todas as cepas de amebas, invasivas ou não, apresentam uma molécula de adesão, com estrutura altamente

conservada, conhecida como *Gal/GalNAc inhibitable adhesion lectin* (lectina de adesão inibível por galactose e N-acetil-D-galactosamina). No entanto, há diferenças antigênicas (que podem ser detectadas com anticorpos monoclonais específicos) e funcionais entre as lectinas de adesão de *E. histolytica* e *E. dispar*. Há também diferenças na composição de glicoconjugados de membrana, como as moléculas semelhantes a lipofosfoglicano (LPG), abundantes somente em *E. histolytica*, e lipofosfopeptoglicano (LPPG), comuns às duas espécies.

Do ponto de vista diagnóstico, existem diferenças genéticas, demonstráveis por métodos moleculares, úteis para a distinção entre as duas espécies. Entre os principais alvos está o gene que codifica a subunidade 18S de RNA ribossômico, amplamente explorado com finalidade diagnóstica (Fotedar et al., 2007).

Lesão intestinal causada por *Entamoeba histolytica*

As formas invasivas da amebíase são resultado de uma sequência de eventos bem caracterizados (Figura 8.4). O ambiente ácido do estômago serve como a primeira barreira contra os patógenos entéricos, mas os cistos de *Entamoeba* resistem ao baixo pH e o excistamento ocorre somente no lúmen do intestino delgado terminal ou nas primeiras porções do intestino grosso. A adesão das amebas à camada de muco que reveste o epitélio intestinal é a primeira etapa do processo que levará a uma erosão do epitélio da mucosa intestinal (Watanabe; Petri, 2015). A adesão é mediada pela lectina de adesão inibível por *Gal/GalNAc*, um heterodímero composto por três proteínas, uma cadeia pesada, uma cadeia intermediária e uma cadeia leve. Mais especificamente, um domínio de reconhecimento de carboidratos localizado no domínio extracelular da cadeia pesada é o responsável pela adesão à mucina, o principal componente dessa camada mucosa. Uma vez aderidas, as amebas secretam glicosidases e proteases, especialmente cisteína-proteases, que degradam os polímeros do muco. As amebas restritas ao muco intestinal geralmente não causam sintomas. A lectina de adesão inibível por *Gal/GalNAc* não somente participa do fenômeno de adesão ao muco, mas também bloqueia a deposição, na superfície das amebas, do complexo de ataque de membrana do sistema complemento, impedindo sua lise. Essa lectina de adesão é também alvo de imunidade protetora, naturalmente adquirida, mediada por anticorpos de classe IgA (Stanley Jr., 2006); por isso, é considerada um potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas contra a amebíase (Singh et al., 2016). A degradação da camada mucosa, como consequência da ação enzimática, torna possível o contato inicial entre as amebas e suas células-alvo, os enterócitos. A partir dessa etapa inicia-se o processo de quebra da barreira epitelial, com alteração do transporte de íons e de absorção de nutrientes, inflamação local e sistêmica e mudança da composição da microbiota intestinal que caracteriza a amebíase como doença.

Uma vez aderidas aos enterócitos, as amebas desencadeiam a morte das células do epitélio intestinal mediante dois processos distintos (Figura 8.5). O primeiro é a apoptose. As amebas fagocitam exclusivamente as células apoptóticas (Ackers; Mirelman, 2006). Entre os componentes com ação digestiva produzidos pelos trofozoítos de *E. histolytica* encontram-se as proteínas formadoras de poros A, B e C, conhecidas coletivamente como *amoebapore*, cuja principal função, no interior dos vacúolos fagocitários, consiste na inativação e morte das bactérias ingeridas pelas amebas. No entanto, não há

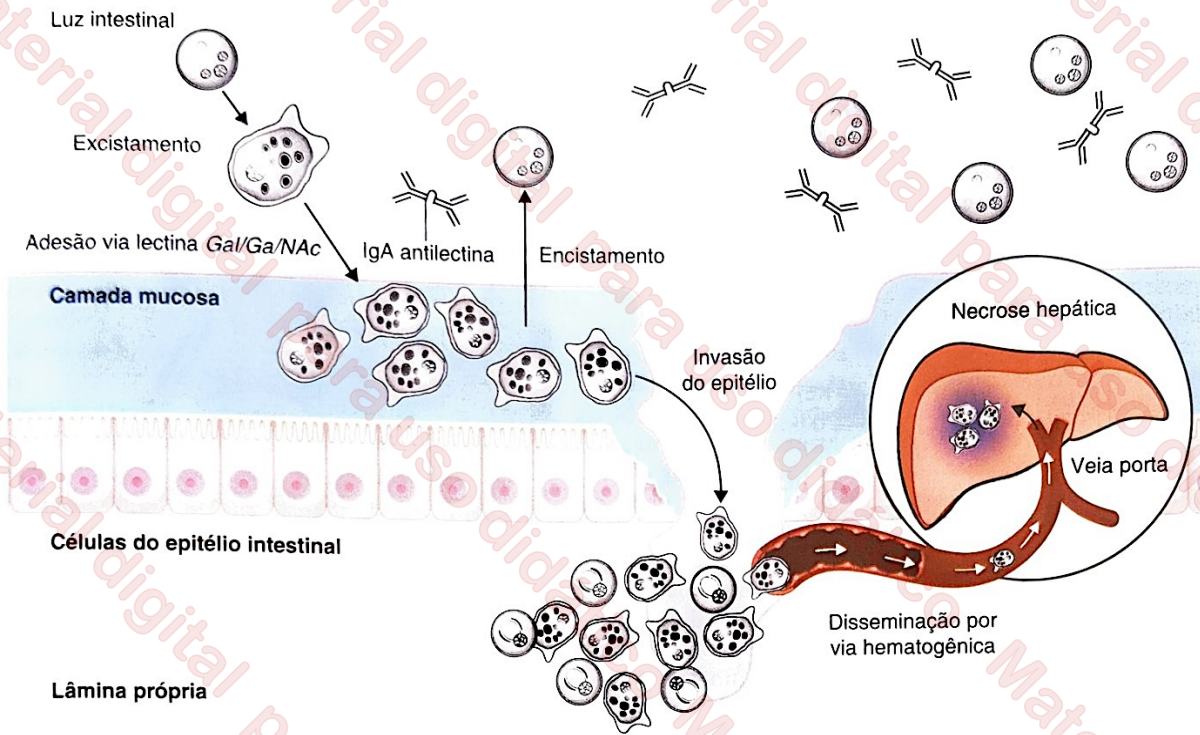


FIGURA 8.4 Sequência de eventos que resultam na amebíase invasiva. O excistamento ocorre na luz do intestino e os trofozoítos aderem à camada mucosa que recobre as células epiteliais, via lectina Gal/Ga/NAc. Os componentes da camada mucosa são degradados por glicosídeos e proteases. Os trofozoítos desencadeiam a morte das células epiteliais, ultrapassam a lâmina própria e podem chegar a vasos sanguíneos da submucosa, disseminando-se por via hematogênica e podendo chegar ao fígado e a outros órgãos. Adaptada de Watanabe; Petri, 2015.

evidência de participação da *amoebapore* na morte de células do hospedeiro desencadeada pelo contato com as amebas. O segundo processo de morte celular, recentemente desvendado, é conhecido como *trogocitose* (Figura 8.5). Trata-se da internalização de fragmentos de células hospedeiras vivas, resultando em elevação dos níveis intracelulares de cálcio e morte celular. A trogocitose, entretanto, só é desencadeada quando a ameba interage com enterócitos vivos, com a participação da lectina de adesão inibível por Gal/GalNAc; os enterócitos apoptóticos são ingeridos por fagocitose (Ralston, 2015). A morte celular estimula a produção de pré-interleucina (IL) 1 β e de IL-1 β , que, por sua vez, ativam o fator de transcrição nuclear NF- κ B, o que resulta na produção de diversos mediadores de inflamação (IL-1 α , IL-8, IL-6, COX-2, GM-CSF) e no recrutamento de neutrófilos. Este processo é facilitado pelas cisteína-proteases das amebas, capazes de converter pré-IL-1 β em sua forma ativa, IL-1 β . Além disso, os trofozoítos são capazes de produzir prostaglandina E2, que estimula a produção de IL-8. A migração de neutrófilos e outros leucócitos, atraídos pelos mediadores liberados, agrava a lesão epitelial. Nas áreas de erosão epitelial inicia-se a invasão das amebas, preferencialmente através do epitélio interglandular. Em sua passagem até as camadas internas da mucosa intestinal, as amebas lisam células e degradam componentes da matriz extracelular. Neste processo agem as diversas cisteína-proteases produzidas pelas amebas. Pelo menos oito cisteína-proteases distintas foram caracterizadas em *E. histolytica*. A morte de neutrófilos recrutados para a lesão resulta na liberação de mais citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , contribuindo para agravar a inflamação e a destruição celular, com consequente aumento da permeabilidade intestinal.

Aspectos clínicos da amebíase

• Amebíase intestinal

Os indivíduos que ingerem cistos de *E. histolytica* podem infectar-se ou não. Quando infectados, podem tornar-se portadores crônicos assintomáticos (possivelmente quando as amebas restringem-se à camada mucosa, sem interação direta com o epitélio intestinal), apresentar disenteria moderada a grave, a chamada *disenteria amebiana*, ou ainda apresentar colite sem disenteria, a chamada *colite amebiana não disentérica*. A composição da microbiota intestinal e as diferenças de virulência entre cepas de *E. histolytica* estão entre os determinantes do desfecho clínico. Cerca de 3 a 10% dos portadores assintomáticos de infecção, se não tratados, desenvolvem sintomas de doença invasiva ao final de 1 ano de seguimento. Tradicionalmente, distinguem-se quatro formas clínicas principais de amebíase intestinal invasiva, todas de evolução aguda: *disenteria amebiana* ou diarreia sanguinolenta, *colite fulminante*, *apendicite amebiana* e *ameboma do cólon*. As síndromes diarreicas e disentéricas correspondem a 90% dos casos de amebíase intestinal invasiva. Os pacientes apresentam geralmente três a cinco evacuações por dia, sem febre. Ocorre dor moderada em cólica precedendo as evacuações, bem como tenesmo retal nos casos de disenteria. A disenteria amebiana é a diarreia com muco e sangue nas fezes. A retossigmoidoscopia mostra a mucosa intensamente inflamada, com ou sem ulcerações. Na colite amebiana não disentérica, observam-se episódios recorrentes de diarreia sem muco ou sangue nas fezes, tendo a mucosa do cólon um aspecto geralmente normal à retossigmoidoscopia. A colite fulminante ou

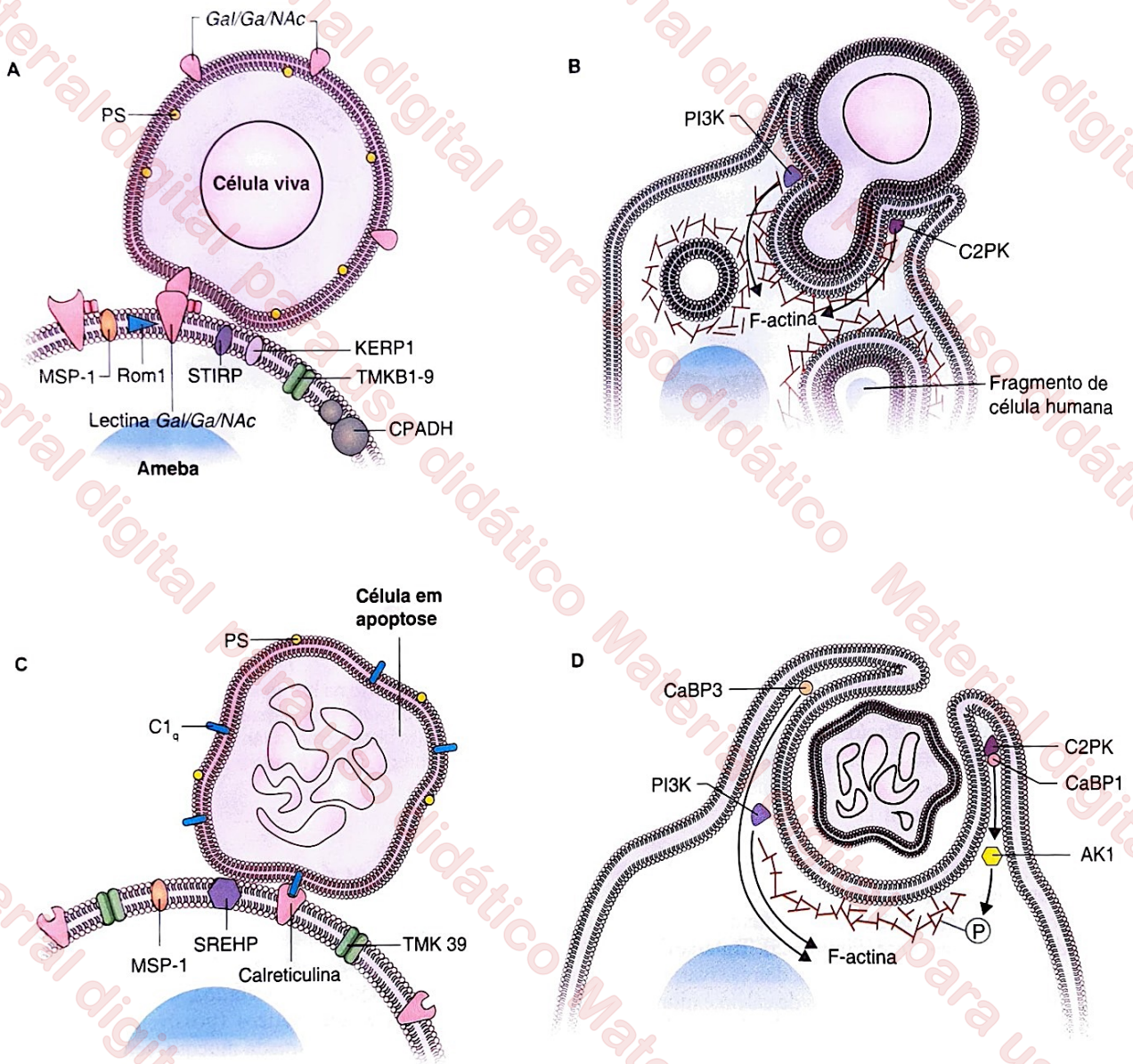


FIGURA 8.5 Sequência de eventos que desencadeiam a morte das células do epitélio intestinal. **A.** O trofozoíto adere à célula do epitélio intestinal, via lectina *Gal/Ga/NAc*, que reconhece *Gal/Ga/NAc* na célula do hospedeiro. Entre as demais moléculas envolvidas nesse processo encontram-se a STIRP (uma proteína transmembrana rica em serina, teronina e isoleucina) e TMKb1-9 (uma quinase transmembrana). **B.** Uma das possíveis consequências dessa interação entre o trofozoíto e a célula do hospedeiro é a trogocitose, a internalização de fragmentos de células hospedeiras vivas, resultando em elevação dos níveis intracelulares de cálcio e morte celular. Esse processo requer a sinalização via Pf3K e C2PK para a polimerização de actina. **C.** A interação com o trofozoíto pode também resultar na apoptose da célula epitelial, que passa a expressar fosfatidilserina (PS) e a proteína do complemento C1q em sua membrana. A adesão da ameba ao enterócito apoptótico, mediada pela interação entre calreticulina e C1q, é o primeiro passo para a fagocitose. **D.** Os enterócitos apoptóticos e aqueles que sofreram trogocitose são ingeridos por fagocitose, dependente da sinalização via Pf3K e C2PK, que é essencial para a polimerização da actina. Adaptada de Ralston, 2015.

necrosante, que compreende 0,5% dos casos de doença invasiva, é um quadro de evolução rápida, em que os pacientes apresentam 30 ou mais evacuações diárias acompanhadas de cólicas intensas e tenesmo. A letalidade situa-se em torno de 40%. Os amebomas são lesões pseudotumorais resultantes de necrose, inflamação e edema da mucosa e submucosa do cólon.

Nos primeiros estágios de invasão das células epiteliais, as amebas podem causar reações inflamatórias, com edema e hiperemia – lesões inespecíficas precursoras de ulcerações

focais. Inicialmente estas ulcerações são superficiais e depois estender-se à submucosa, com rápida disseminação das amebas. Essa característica dá à lesão causada por *E. histolytica* um aspecto típico, com lesão epitelial desproporcional à da submucosa. Raramente são encontrados neutrófilos e eosinófilos em úlceras da mucosa intestinal humana, mas se observa um intenso infiltrado linfocitário. Os trofozoítos são circundados por um halo claro, resultante de citólise; por isso, o nome específico de *histolytica*.

Amebíase extraintestinal

Outros órgãos podem ser infectados secundariamente por *E. histolytica*. O fígado pode ser atingido por disseminação sistêmica, causando o chamado *abscesso amebiano de fígado*, terminologia considerada inadequada para a maioria dos patologistas por não se tratar de verdadeiro abscesso. Prefere-se atualmente a denominação de *necrose amebiana de fígado*. O quadro clínico caracteriza-se por início súbito, com dor no hipocôndrio direito que aumenta à inspiração profunda, geralmente acompanhada de febre. Raramente ocorre icterícia. Por motivos desconhecidos, a amebíase hepática é muito mais comum em homens do que em mulheres, e incomum em crianças.

As lesões podem ser únicas ou múltiplas e, nos casos mais graves, muito extensas. Os protozoários que se desprendem dos bordos das lesões podem penetrar outros locais do fígado. O pulmão direito em geral é atingido por contiguidade ou extensão, pelo diafragma, a partir de lesões hepáticas (ver Figura 8.2B). As lesões pulmonares apresentam também aspecto necrótico e podem ser múltiplas. Em casos graves, porém relativamente raros, o cérebro também pode apresentar focos necróticos. Eventualmente a pele, sobretudo a região perianal, pode ser afetada.

Diagnóstico laboratorial e tratamento da amebíase

O diagnóstico laboratorial da amebíase intestinal é rotineiramente realizado por meio de exame parasitológico de fezes. Em fezes diarreicas ou disentéricas, predominam as formas trofozoíticas; nas fezes formadas predominam os cistos. O encontro de trofozoítos nas fezes exige o exame de amostra fresca ou preservada; se não fixados adequadamente até 30 minutos após a sua eliminação nas fezes, os trofozoítos tendem a degenerar-se. Para a identificação das características morfológicas que possibilitam distinguir trofozoítos de *E. histolytica*/*E. dispar* de trofozoítos de amebas comensais, as preparações devem ser coradas, geralmente com hematoxilina férrica ou tricrômico, antes do exame microscópico. O achado de cistos, em fezes formadas, é geralmente feito com o auxílio de métodos de concentração. Entre eles, os mais frequentemente utilizados na prática diagnóstica são os métodos de Hoffmann e colaboradores, que se baseia na sedimentação de elementos parasitários por ação da gravidade, e o de Faust e colaboradores, que objetiva concentrar os elementos parasitários mediante diversas etapas de centrifugo-flutuação das amostras de fezes (ver Capítulo 20, *Diagnóstico Parasitológico*).

Embora o cultivo de amebas intestinais seja realizado em laboratórios de pesquisa há quase nove décadas, seu uso para diagnóstico não é amplamente recomendado. A sensibilidade é relativamente baixa (50 a 70%), mesmo em laboratórios de referência, e o procedimento é excessivamente laborioso para sua implementação na rotina diagnóstica. Entretanto, o cultivo *in vitro* pode ser utilizado para a posterior caracterização biológica e bioquímica de isolados de amebas.

Como o exame microscópico não possibilita distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*, o desenvolvimento de métodos imunológicos e moleculares com essa finalidade recebeu grande impulso em décadas recentes (Fotedar et al., 2007). Há cinco imunoenaios comercialmente disponíveis para a detecção específica de antígenos de *E. histolytica* nas fezes com o uso

de anticorpos monoclonais, embora nenhum deles seja de uso disseminado em laboratórios de análises clínicas do Brasil.

Os métodos laboratoriais mais sensíveis para o diagnóstico da amebíase humana são aqueles fundamentados na reação em cadeia da polimerase (PCR). O primeiro obstáculo para o desenvolvimento de ensaios moleculares foi a padronização de métodos apropriados para a conservação e a extração de DNA de cistos e trofozoítos do parasito a partir de amostras de fezes, extremamente ricas em substâncias capazes de inibir a ação das DNA polimerases. Atualmente, entretanto, são encontrados diversos produtos comerciais que possibilitam a extração rápida e eficaz de DNA a partir de amostras fecais frescas ou preservadas. Dos inúmeros alvos moleculares usados em ensaios com diferentes formatos, desde a PCR convencional até os protocolos de PCR em tempo real, o mais comum é o gene que codifica a subunidade 18S de RNA ribossômico (Fotedar et al., 2007). Diversos métodos disponíveis em laboratórios de referência possibilitam a distinção entre *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*, embora nenhum deles seja amplamente empregado nos laboratórios de rotina diagnóstica do Brasil. Os métodos moleculares possibilitam também, de modo mais simples e sensível que a análise de zimodemas, examinar níveis de diversidade genética existentes em isolados naturais de *E. histolytica* de diferentes regiões endêmicas, associados a padrões distintos de doença.

O diagnóstico de abscesso amebiano pode ser relativamente difícil e depende, em grande parte, de dados clínicos e epidemiológicos. Exames de imagem, como a ultrassonografia ou a tomografia computadorizada, tornam possível a identificação de abscessos hepáticos. Em geral não se recomenda a punção dos abscessos amebianos, com finalidade diagnóstica ou terapêutica, diante do risco de contaminação bacteriana secundária. Entretanto, os métodos imunológicos e moleculares de detecção de amebas nas fezes podem também ser utilizados com material obtido por meio de punção de abscessos.

Os testes sorológicos são positivos para anticorpos na maioria dos indivíduos com amebíase intestinal invasiva (75%) e abscesso amebiano (90%). O imunoensaio enzimático (ELISA), considerado teste de referência, tem grande utilidade diagnóstica na amebíase extraintestinal de indivíduos provenientes de áreas não endêmicas, em que a presença de anticorpos em pacientes com um quadro clínico sugestivo pode ser interpretada como a confirmação do diagnóstico. Entretanto, em área endêmica, muitos indivíduos saudáveis podem apresentar anticorpos detectáveis meramente em função de infecções prévias. Existem pelo menos sete imunoenaios enzimáticos para a detecção de anticorpos específicos contra *E. histolytica* comercialmente disponíveis. Os testes de aglutinação em látex, desenvolvidos com a mesma finalidade, são raramente utilizados hoje em dia em função de sua baixa especificidade (Fotedar et al., 2007).

O tratamento de amebíase depende da forma clínica encontrada. As estratégias de tratamento baseiam-se em agentes com ação predominante no lúmen intestinal, utilizados nas formas não invasivas, e aqueles com melhor penetração nos tecidos, utilizados nas formas invasivas. Na forma intestinal assintomática, utilizam-se geralmente uma dicloroacetamida (etofamida) ou uma benzilamina (teclosan) como amebicidas de ação luminal nos seguintes esquemas:

- *Etofamida*: 500 mg, 2 vezes/dia, durante 3 dias
- *Teclosan*: 500 mg, de 8 em 8 horas, por 1 dia, ou 100 mg, 3 vezes/dia, durante 5 dias.

Alternativamente, pode-se empregar um composto nitroimidazólico com ação tecidual:

- *Tinidazol*: 2 g/dia, durante 2 a 5 dias, em adultos; 50 mg/kg/dia, durante 2 dias, em crianças.

Há poucos ensaios clínicos aleatorizados de boa qualidade metodológica que avaliaram o tratamento da amebíase invasiva ou extraintestinal. Em geral, empregam-se derivados nitroimidazólicos nas seguintes dosagens:

- *Metronidazol*: 500 a 750 mg/dose, 3 vezes/dia, durante 10 dias, em adultos; 20 a 40 mg/dia, durante 10 dias, em crianças
- *Tinidazol*: 2 g/dia, durante 2 a 5 dias, em adultos; 50 mg/kg/dia, durante 2 a 5 dias, em crianças.

O esquema fundamentado em tinidazol parece ser ligeiramente superior, em termos de eficácia, no tratamento da colite amebiana, embora o número disponível de estudos para comparação ainda seja pequeno (Gonzales et al., 2009). Nas formas intestinais, sugere-se realizar a pesquisa de cistos e trofozoítos nas fezes, como controle de cura, 7, 14, 21 e 28 dias após o término do tratamento.

Prevenção e controle da amebíase

Entamoeba histolytica e *E. dispar* são cosmopolitas, embora as infecções amebianas ocorram mais frequentemente na Ásia, na África e na América Latina. *Entamoeba histolytica*, junto com *Cryptosporidium* spp. e *G. duodenalis*, está entre os protozoários mais frequentemente encontrados no esgoto não tratado. Estima-se que 500 milhões de indivíduos sejam portadores de *Entamoeba* em todo o mundo. Sabe-se hoje que *E. dispar* é dez vezes mais comum do que *E. histolytica*, motivo pelo qual o número anual de casos sintomáticos de amebíase se situa em torno de 50 milhões. A amebíase é a quarta causa mais frequente de morte por protozoários (100.000 mortes anuais), situando-se depois da malária, da doença de Chagas e das leishmanioses (Lozano et al., 2012). Nos países desenvolvidos, a ocorrência de amebíase está, em geral, ligada à imigração de trabalhadores vindos de países em desenvolvimento. Nas áreas urbanas do Sudeste do Brasil, a amebíase intestinal vem se tornando progressivamente menos comum, e são raros os casos de disseminação extraintestinal.

A amebíase é uma típica doença de transmissão orofecal, cuja profilaxia depende de condições sanitárias adequadas e de educação sanitária. A principal fonte de infecção são os indivíduos assintomáticos que eliminam cistos por longos períodos sem procurar tratamento, formando um importante reservatório de infecção. Os pacientes com disenteria amebiana são relativamente pouco importantes para a disseminação da infecção, pois eliminam predominantemente trofozoítos que se degeneram ao cair no meio externo; além disso, quando confirmado o diagnóstico, são tratados. O principal veículo de transmissão de cistos é a água, embora alimentos como vegetais e frutas também desempenhem um papel importante. Manipuladores de alimentos também são importantes na transmissão, bem como moscas e baratas, considerados vetores mecânicos. A contaminação pessoa a pessoa também é possível. Como os cistos de *Entamoeba* são sensíveis à dessecação, a transmissão pelo ar não é relatada. A identificação e o tratamento dos excretores assintomáticos de cistos é uma estratégia potencial de controle, porém de difícil implementação em áreas de alta transmissão.

Giardia duodenalis e a giardíase

Somente no fim da década de 1970, *G. duodenalis* foi amplamente reconhecida como causador de doença humana. Em 1981, foi colocada pela Organização Mundial da Saúde na lista de microrganismos patogênicos. Na década seguinte, a giardíase foi reconhecida como uma doença tropical negligenciada (Savioli et al., 2006). O estudo clássico de Theodore Nash em voluntários humanos possibilitou preencher os quatro postulados de Koch para definir *Giardia* como causa de doença diarreica em seres humanos (Nash et al., 1987).

Giardia duodenalis tem distribuição global, e é o parasito intestinal mais frequentemente diagnosticado em países desenvolvidos. Nos EUA, por exemplo, *Giardia* é um agente comumente associado a surtos de diarreia veiculados pela água. Cerca de 200 milhões de indivíduos apresentam giardíase sintomática na Ásia, na África e na América Latina, com 500.000 novos casos relatados a cada ano. Consequentemente, a giardíase é uma das principais causas de diarreia entre viajantes que visitam essas regiões. A infecção também é comum em animais domésticos, principalmente em cães, gatos e no gado (Thompson, 2000).

Taxonomia de *Giardia*

A taxonomia do gênero *Giardia* permanece controversa há várias décadas. Na primeira metade do século XX, dezenas de espécies foram descritas com base nos hospedeiros em que foram encontradas e em discretas variações morfológicas, nem sempre confirmadas de modo independente. A partir do trabalho clássico de Filice (1952), passou-se geralmente a admitir a existência de somente três espécies morfolologicamente distintas de *Giardia*: *G. duodenalis*, que ocorre na maioria dos mamíferos, incluindo o ser humano e animais domésticos; *G. agilis*, de anfíbios; e *G. muris*, de roedores. Mais recentemente, duas novas espécies foram descritas em pássaros, *G. psittaci* e *G. ardeae*, e uma em roedores, *G. microti*. *Giardia duodenalis* tem dois sinônimos frequentemente encontrados na literatura médica: *G. lamblia* e *G. intestinalis*.

Nas últimas décadas, foram definidos oito agrupamentos genéticos, ou *assemblages* (A, B, C, D, E, F, G e H), de *G. duodenalis* com características epidemiológicas distintas, ainda que os isolados classificados em cada agrupamento sejam morfolologicamente indistinguíveis. Alguns deles circulam em hospedeiros específicos e podem corresponder a espécies definidas com base no hospedeiro em que foram originalmente encontradas. Entretanto, os dois principais grupos, A e B, compreendem parasitos capazes de infectar um grande número de animais domésticos e silvestres, além do ser humano, evidenciando o potencial zoonótico da infecção (Feng; Xiao, 2011). Embora os critérios para a definição de novas espécies de *Giardia* ainda não sejam consensuais, predomina atualmente a tendência de referir-se aos parasitos que infectam o ser humano, pertencentes aos agrupamentos A e B, como *G. duodenalis* e *G. enterica*, respectivamente (Monis et al., 2009). Nesses agrupamentos encontram-se alguns subtipos caracterizados com o uso de genotipagem de múltiplos loci, tais como AI, AII, BIII e BIV (Cacciò et al., 2018). *Giardia duodenalis* que circula exclusivamente em cães (agrupamentos C e D) e em gatos (agrupamento F) corresponderia a duas espécies distintas, *G. canis* e *G. cati*, respectivamente. De modo análogo,

G. bovis e *G. simondi* seriam as novas espécies correspondentes aos isolados de *Giardia duodenalis* reunidos nos agrupamentos E (encontrados principalmente em bovinos, suínos e equinos) e G (encontrados em roedores), respectivamente (Tabela 8.1). *Giardia duodenalis* é o termo taxonômico abrangente empregado neste capítulo para referir-se às espécies de *Giardia* que infectam o ser humano, abrangendo *G. duodenalis* e *G. enterica*.

O primeiro genoma completo de *G. duodenalis* a ser sequenciado deriva de um isolado humano conhecido como WB, pertencente ao agrupamento A (Morrison et al., 2007); subsequentemente, caracterizaram-se os genomas completos de dois isolados dos agrupamentos A e B (de origem humana) e um isolado do agrupamento E (de origem suína). O genoma haploide de *G. duodenalis*, bastante compacto (10 a 12 milhões de pares de bases), compreende cinco cromossomos e cerca de 4.500 genes. A divergência entre os dois genomas obtidos de subtipos distintos (AI e AII) pertencentes ao agrupamento A é de cerca de 1%. Entre as quatro cópias do genoma encontradas nos dois núcleos diploides do mesmo parasito, a divergência entre alelos pode chegar a 0,5% (Ortega-Pierres et al., 2018).

Aspectos biológicos de *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis talvez tenha sido o primeiro protozoário a ser observado em fezes humanas. Foi observado por Anton van Leeuwenhoek, em 1681, que verificou estar ele próprio infectado. No entanto, credita-se ao médico tcheco Vilém Dušan Lambl a primeira descrição detalhada do flagelado, em 1859. Na classificação mais recente, *G. duodenalis* é incluída no clado Diplomonadida (que reúne protozoários flagelados

binucleados) do supergrupo Excavata, grupo Fornicata, subgrupo Eopharyngia, ainda que não apresente um citóstoma funcional (Adl et al., 2005). Em *Giardia* estão ausentes algumas organelas típicas de eucariotos, como peroxissoma, mitocôndria e complexo de Golgi. O papel de mitocôndria é desempenhado pelo mitossoma (Tovar et al., 2003), organela também presente em *Entamoeba* e em microsporídios (ver Capítulo 11, *Os Microsporídios e as Microsporidioses*).

Giardia duodenalis é um parasito monoxeno cujo ciclo vital inclui essencialmente duas formas. Os trofozoítos medem 12 a 15 µm de comprimento e 6 a 8 µm de largura e são piriformes, com simetria bilateral (Figura 8.6). Movimentam-se por intermédio de quatro pares de flagelos e dividem-se aparentemente de modo assexuado, por fissão binária longitudinal. No genoma de *G. duodenalis*, no entanto, encontram-se diversos genes que codificam proteínas necessárias para a meiose em eucariotos, tais como *Dmcl*, *Spo11*, *Mnd1*, *Hop1* e *Hop2* (Ramesh et al., 2005). Além disso, há evidência de recombinação genética entre isolados naturais de *G. duodenalis*, com a descrição de vários exemplos de compartilhamento de características genéticas de mais de um agrupamento, gerando *assemblages* mistas (p. ex., A/B, A/C, A/D, A/E etc.) (Cacciò; Sprong, 2010).

Os trofozoítos contêm dois núcleos diploides transcricionalmente ativos, com cariossoma central grande mas sem cromatina periférica. Não se sabe como o trofozoíto binucleado regula simultaneamente a atividade transcricional de seus dois núcleos (Ortega-Pierres et al., 2018). Os *axonemas*, feixes de microtúbulos que se originam nos corpúsculos basais, percorrem longitudinalmente o citoplasma, formando quatro pares de flagelos de disposição simétrica (McInally; Dawson, 2016). Um ou dois *corpos parabasais* ou *corpos medianos*, em formato de vírgula, estão presentes na maioria dos trofozoítos. De função desconhecida, os corpos parabasais são formados por feixes de microtúbulos (Piva; Benchimol, 2004). Na superfície ventral côncava do trofozoíto há um *disco adesivo* ou *disco suctorial*, de 8 a 10 µm de diâmetro, principal responsável pela fixação do protozoário às células epiteliais do intestino. O disco adesivo repousa sobre uma rede de microtúbulos paralelos dispostos em espiral (Piva; Benchimol, 2004). As *giardinas*, proteínas de 29 a 38 kDa com função adesiva, são encontradas exclusivamente no disco adesivo. Os trofozoítos alimentam-se por meio de pinocitose.

Do processo de encistamento de *Giardia* não se conhecem muitos detalhes. Mudanças de pH e da concentração de sais biliares ao longo do trato digestório parecem estimular o encistamento. As mudanças transcricionais associadas a esse processo vêm sendo caracterizadas (Ortega-Pierres et al., 2018). Os *cistos* são ovalados ou elipsoides e medem cerca de 12 µm (Figura 8.7). São formas de resistência. As estruturas internas são as mesmas dos trofozoítos, só que duplicadas. Durante o encistamento parece haver fusão dos envelopes nucleares (*cariogamia*), sugerindo a existência de uma fase meiótica que possibilita as trocas genéticas entre os núcleos dos cistos (Cacciò; Spring, 2010). Os cistos são bastante resistentes, podendo permanecer viáveis na água a 4°C por até 3 meses.

O hábitat desse flagelado é o intestino delgado, principalmente o duodeno e as primeiras porções do jejuno. O ciclo vital é semelhante ao de *E. histolytica*. A infecção humana ocorre pela ingestão de cistos eliminados nas fezes (Figura 8.8); são necessários de 10 a 100 cistos para que ocorra a infecção. O protozoário descansa-se na luz do intestino delgado.

TABELA 8.1 Distribuição dos oito agrupamentos genéticos atualmente reconhecidos em *Giardia duodenalis*, com nomes recentemente sugeridos para as respectivas espécies, segundo os hospedeiros infectados.

Agrupamento	Nome proposto para a espécie	Hospedeiros principais
A	<i>Giardia duodenalis sensu stricto</i>	Seres humanos, primatas não humanos, canídeos, ruminantes domésticos e silvestres, alpacas, suínos, equinos, canídeos, gatos, furões, roedores, marsupiais e outros mamíferos
B	<i>Giardia enterica</i>	Seres humanos, primatas não humanos, bovinos, cães, cavalos, coelhos, esquilos e ratos-almiscarados
C	<i>Giardia canis</i>	Canídeos domésticos e silvestres
D	<i>Giardia canis</i>	Canídeos domésticos e silvestres
E	<i>Giardia bovis</i>	Bovinos, ovinos, suínos, caprinos e outros ungulados
F	<i>Giardia cati</i>	Gatos
G	<i>Giardia simondi</i>	Roedores
H	Nenhum até o momento	Pinípedes (focas, leões-marinhos, lobos-marinhos e morsas)

Adaptada de Feng; Xiao, 2011.

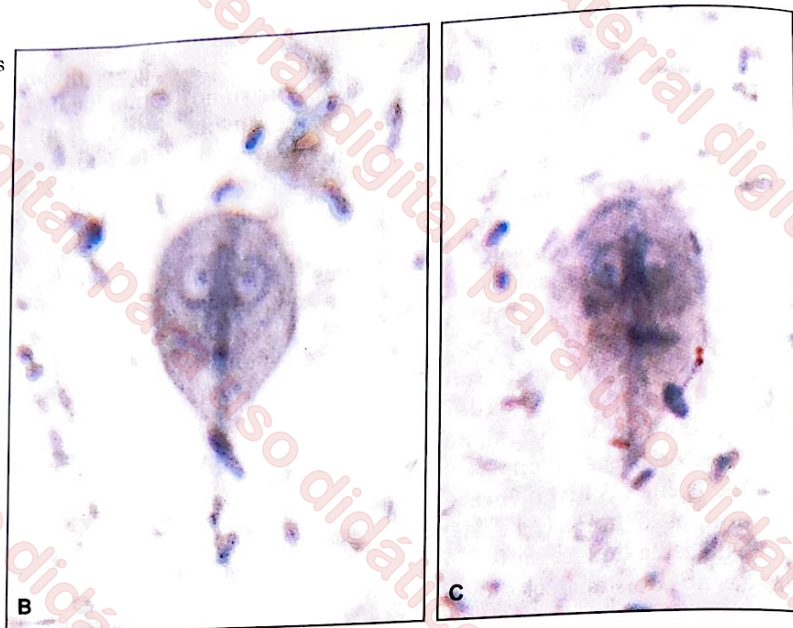
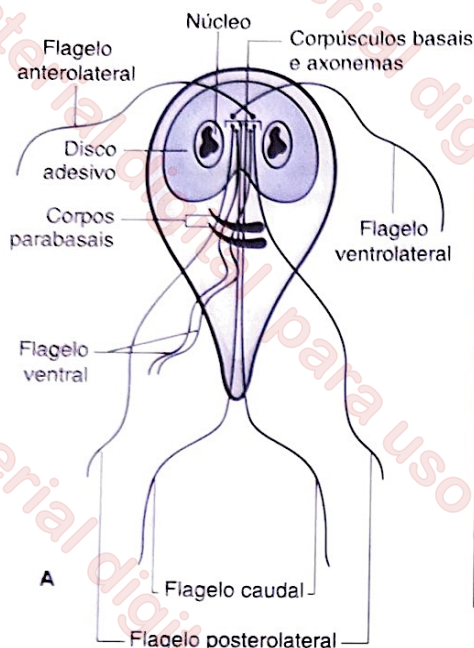


FIGURA 8.6 Trofozoítos de *Giardia duodenalis*. **A.** Representação esquemática do trofozoito de *G. duodenalis*. Observa-se o formato piriforme. O trofozoito apresenta dois núcleos, quatro pares de flagelos e corpos parabasais em forma de vírgula. **B e C.** Trofozoítos de *G. duodenalis* em amostras de fezes corados com hematoxilina férrica. Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

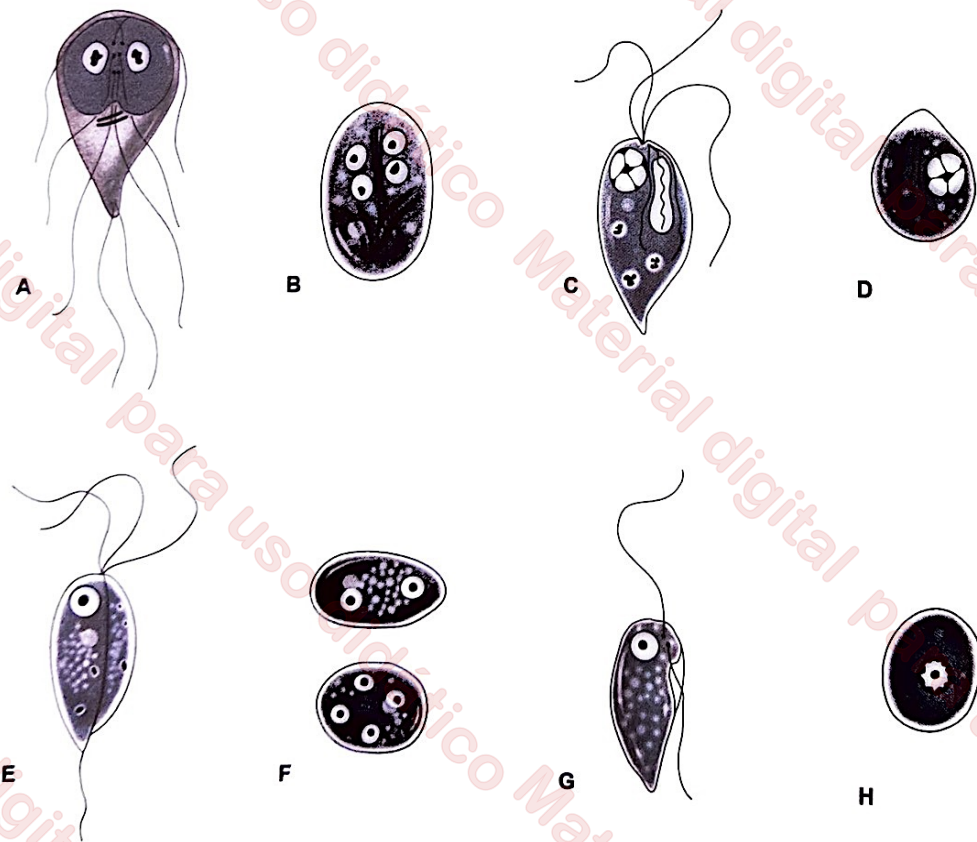


FIGURA 8.7 Representação esquemática dos trofozoítos (**A**) e cistos (**B**) de *Giardia duodenalis* e de outros flagelados intestinais. Observa-se que os cistos de *G. duodenalis* são ovalados (**B**). Podem apresentar dois (cistos imaturos) ou quatro núcleos (cistos maduros), correspondendo, respectivamente, a um ou dois trofozoítos em desenvolvimento em seu interior. Apresentam-se também características morfológicas dos seguintes flagelados comensais do trato digestório humano: trofozoítos (**C**) e cistos (**D**) de *Chilomastix mesnili*, trofozoítos (**E**) e cistos (**F**) de *Enteromonas hominis* e trofozoítos (**G**) e cistos (**H**) de *Retortomonas intestinalis*.

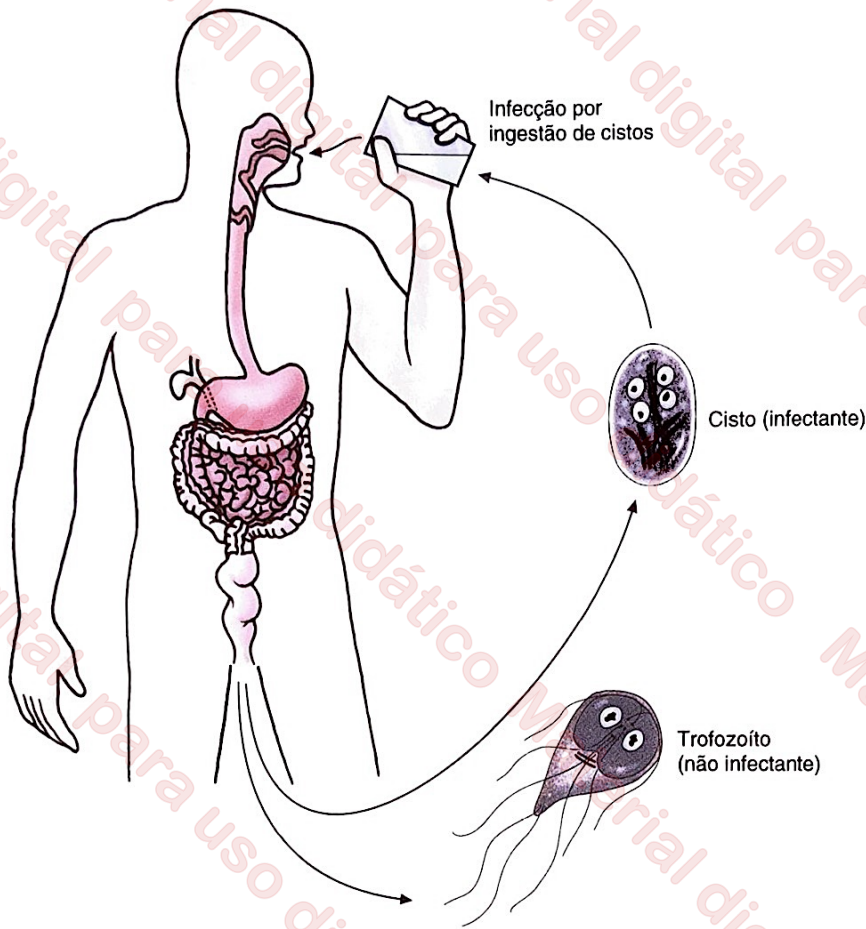


FIGURA 8.8 Ciclo vital de *Giardia duodenalis*. Observa-se que os trofozoítos eventualmente eliminados nas fezes diarréicas não são infectantes.

Mecanismos de lesão intestinal causada por *Giardia duodenalis*

Em seres humanos, a infecção por *Giardia* pode ser assintomática ou produzir até síndromes graves de má absorção. Os fatores que possivelmente contribuem para esta variabilidade de expressão clínica incluem a virulência das cepas de *Giardia*, o número de cistos ingeridos e a idade e o estado imunitário do hospedeiro no momento da infecção. As infecções prévias por *Giardia* produzem certo grau de proteção contra formas clínicas em infecções subsequentes. Por isso, em áreas endêmicas, a maioria das infecções sintomáticas em indivíduos imunocompetentes ocorre em crianças ou em viajantes não imunes, provenientes de áreas de baixa transmissão. Em pacientes semi-imunes, a fase aguda pode resolver-se espontaneamente. Se isso não acontecer, segue-se um estágio crônico. A aquisição de imunidade protetora é, pelo menos em parte, restrita pelo fenômeno de variação clonal antigênica, que possibilita ao parasito mudar rapidamente suas glicoproteínas de superfície mais imunogênicas.

Não se conhece em detalhes a fisiopatologia das alterações intestinais na giardíase. Na Figura 8.9 apresentam-se esquematicamente alguns mecanismos de patogenia propostos até o momento. *Giardia* coloniza preferencialmente o duodeno e o jejuno, um ambiente hostil em que poucos microrganismos são capazes de sobreviver. Os trofozoítos não invadem as

células intestinais do hospedeiro, revestidas por uma camada de muco; no entanto, aderem ao epitélio com auxílio do disco adesivo presente em sua superfície ventral, bem como de proteínas com ação de lectina. Entre elas, destaca-se a giardina α -1, uma das proteínas imunodominantes na superfície de *G. duodenalis*, que se liga a moléculas sulfatadas no epitélio intestinal (Roxström-Lindquist et al., 2006). A corrente líquida produzida pelo batimento dos flagelos também auxilia na adesão ao epitélio intestinal.

Em textos clássicos menciona-se que os parasitos aderidos à mucosa intestinal podem constituir uma barreira mecânica para a absorção de nutrientes. No entanto, a grande reserva funcional do intestino delgado, cuja área é equivalente à de uma quadra de tênis, torna essa hipótese insustentável diante das pequenas dimensões do parasito. As lesões mais evidentes na morfologia da mucosa intestinal são a *atrofia de vilos* e a *hiperplasia das criptas*, que podem reduzir a superfície disponível para a absorção de nutrientes. No entanto, podem ocorrer sintomas em pacientes sem atrofia de vilos, sugerindo que essa alteração não explica completamente a patogênese da giardíase.

Do ponto de vista funcional, a alteração mais frequentemente associada à infecção por *G. duodenalis* é a redução da atividade de diversas enzimas da orla em escova da mucosa intestinal, como a maltase, a sucrase, a lactase, a sacaridase e outras, bem como de enzimas do lúmen intestinal, como a tripsina, a quimiotripsina, a amilase e a lipase. Os fatores que

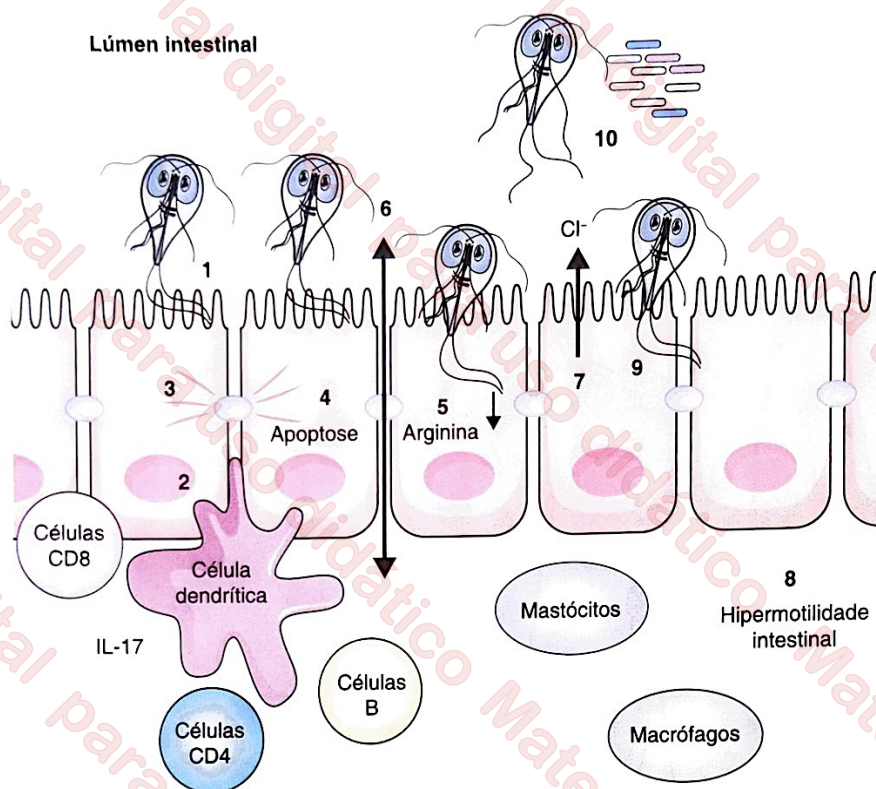


FIGURA 8.9 Patogênese da giardíase. (1) Os trofozoítos aderem ao epitélio com auxílio do disco adesivo presente em sua superfície ventral, bem como de proteínas com ação de lectina. (2) A interação entre os trofozoítos e o enterócito induz a liberação de quimiocinas que, por sua vez, atraem mastócitos, células dendríticas e outras células do sistema imune. (3) A inflamação resultante produz a ruptura das junções aderentes entre as células epiteliais, bem como (4) a apoptose dos enterócitos. (5) Os trofozoítos consomem grande quantidade de arginina em seu metabolismo energético; a falta de arginina disponível para o enterócito aumenta sua propensão à apoptose. (6) A perda das junções aderentes intercelulares e a morte celular por apoptose produzem aumento da permeabilidade intestinal. (7) O aumento da secreção de cloretos pelo enterócito, levando ao acúmulo de líquido no lúmen intestinal, e a hipermotilidade intestinal (8), decorrente do aumento de secreção de hormônios digestivos como a motilina, contribuem para a diarréia, agravada pela hiperplasia das criptas intestinais (9), que reduz a superfície disponível para a absorção de água e nutrientes. Finalmente, acredita-se que a giardíase produza alterações na composição da microflora intestinal (10) que podem afetar a resposta do hospedeiro à presença do próprio parasito e de outros patógenos intestinais. Adaptada de Einarsson et al., 2016.

levam à redução de atividade dessas enzimas permanecem desconhecidos, mas suas consequências (essencialmente a redução da absorção de carboidratos, gorduras e vitaminas) são bem documentadas na literatura. A giardíase produz também aumento da *permeabilidade intestinal*, provavelmente como consequência de *inflamação da mucosa* e *apoptose de enterócitos* (Troeger et al., 2007), bem como *aumento da secreção de cloretos*, levando ao acúmulo de líquido no lúmen intestinal durante a infecção (Buret, 2007). Observa-se também *aumento da motilidade intestinal*. Finalmente, acredita-se que a giardíase produza alterações na *composição da microflora intestinal* que podem afetar a resposta do hospedeiro à presença do próprio parasito e de outros patógenos intestinais. Falta definir, no entanto, a contribuição relativa de cada um desses fatores para a enteropatia aguda observada na giardíase (Bartelt; Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016).

Aspectos clínicos da giardíase

A *infecção assintomática* ocorre tanto em adultos como em algumas crianças. Estima-se que, em países industrializados, 5 a 15% dos portadores de infecção permaneçam sem sintomas mesmo se não tratados. Entre crianças de países em

desenvolvimento, a infecção é extremamente comum, mas frequentemente deixa de ocorrer diarréia; ainda assim, episódios repetidos de infecção levam ao retardo do crescimento ao longo dos dois primeiros anos, sugerindo que as infecções subclínicas tenham algum impacto nutricional (Donowitz et al., 2016; Bartelt; Platts-Mills, 2016). É possível que alguns indivíduos classificados como assintomáticos apresentem episódios de diarréia transitória, que escapam ao registro clínico. A *giardíase aguda* caracteriza-se como uma doença diarréica, com duração entre 2 e 4 semanas. Os sinais e sintomas mais comuns são a esteatorreia e o desconforto abdominal; pode haver náuseas, vômitos e perda de peso. Na fase inicial da doença, a diarréia é frequentemente explosiva, mas progressivamente as evacuações se tornam mais intermitentes. Embora a infecção seja autolimitada na maioria dos indivíduos imunocompetentes, cerca de 30 a 50% deles apresentam diarréia crônica (duração superior a 2 semanas). Em 25% dos pacientes não imunes, os sintomas podem persistir por 7 semanas ou mais. Nesses casos, a perda de peso pode ser pronunciada em função das dificuldades de absorção de diversos nutrientes. Pode haver deficiência secundária de lactase em até 40% dos pacientes, criando dificuldades de absorção de lactose. Se não tratadas, as infecções podem durar vários meses, com exacerbação periódica do quadro diarréico. As infecções crônicas

são mais comuns entre indivíduos com baixa produção de anticorpos, como os portadores de agamaglobulinemia ligada ao X, de imunodeficiência comum variável e de deficiência de IgA (Minetti et al., 2016).

Diagnóstico laboratorial e tratamento da giardíase

A infecção humana por *G. duodenalis* é, em geral, diagnosticada por meio de exame parasitológico de fezes (ver Capítulo 20, *Diagnóstico Parasitológico*). Em fezes diarreicas, espera-se encontrar trofozoítos do parasito, situação em que amostras recém-emitidas devem ser examinadas por método direto, preferencialmente com coloração pela hematoxilina férrica ou pelo tricrômico. Nas fezes formadas, predominam cistos. Para o encontro de cistos, são geralmente necessárias técnicas de concentração, a fim de separá-los de partículas interferentes presentes nas fezes. Os métodos de sedimentação de Hoffman et al. e de centrifugo-flutuação de Faust et al. são os mais utilizados em nosso meio com essa finalidade. Os cistos podem ser corados com solução de Lugol, hematoxilina férrica ou tricrômico (Figura 8.10). Como os trofozoítos e, principalmente, os cistos de *G. duodenalis* são eliminados intermitentemente nas fezes, sugerem-se a coleta e o exame de pelo menos três amostras fecais, colhidas ao longo de 1 semana, para aumentar a sensibilidade do exame parasitológico. Estima-se que a sensibilidade de um único exame de fezes esteja em torno de 60 a 80%, enquanto três exames seriados seriam capazes de detectar mais de 90% das infecções por *G. duodenalis*. Ocasionalmente, aspirados duodenais são obtidos para o diagnóstico de giardíase pelo encontro de trofozoítos. A obtenção de amostras de tecido por biópsia é raramente justificada, mas o achado do parasito é possível em amostras obtidas por aposição do fragmento de tecido em uma lâmina, seguida de fixação e coloração.

Existem diversos produtos comerciais para a detecção de antígenos de *G. duodenalis* nas fezes, por meio de imunoenensaio enzimático (ELISA) de captura, com sensibilidade entre

85 e 98% e especificidade superior a 90%. O teste mais utilizado tem como alvo a glicoproteína GSA 65, presente em cistos e trofozoítos, e pode ser realizado com amostras congeladas ou mantidas em soluções preservativas (Soares; Tasca, 2016). Alguns dos testes comercialmente disponíveis, como o Tri-Combo (produzido nos EUA pela empresa TechLab), detectam não somente antígenos de *G. duodenalis*, mas também de outros protozoários intestinais como *E. histolytica/dispar*, *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis*. A sensibilidade situa-se acima de 90%, com especificidade de 97 a 99% (Soares; Tasca, 2016). Os métodos moleculares para o diagnóstico de giardíase, que se baseiam na amplificação de sequências de DNA do parasito com a reação em cadeia da polimerase (PCR), em versão convencional ou em tempo real, permanecem essencialmente restritos ao ambiente de pesquisa. Os principais alvos de PCR são os genes *18S rRNA* e *gdh*, proporcionando uma sensibilidade de 90 a 94% (Soares; Tasca, 2016). Por outro lado, os métodos de detecção de anticorpos séricos contra *G. duodenalis* são utilizados em estudos epidemiológicos, com o objetivo de estimar a população exposta ao parasito, mas não distinguem infecções atuais de pregressas. Por isso, não são em geral aplicados rotineiramente em análises clínicas. As técnicas de cultivo do parasito *in vitro* são raramente utilizadas com finalidade diagnóstica.

Os compostos nitroimidazólicos, como metronidazol, tinidazol, secnidazol, ornidazol e nimorazol, são os principais agentes atualmente empregados no tratamento da giardíase. Em geral, são recomendados os seguintes esquemas terapêuticos:

- *Tinidazol, secnidazol, ornidazol, nimorazol*: 2 g, dose única, em adultos; 50 mg/kg, também dose única, em crianças
- *Metronidazol*: 250 mg, 3 vezes/dia, durante 5 a 10 dias, em adultos; 5 mg/kg/dia, 3 vezes/dia, por 5 a 10 dias, em crianças.

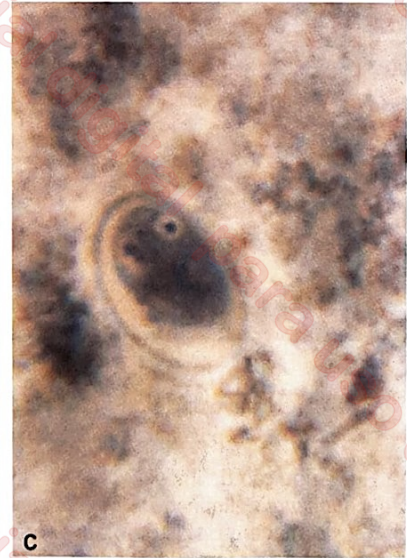
A *resistência* aos compostos nitroimidazólicos vem sendo descrita na giardíase, mas sua prevalência é desconhecida (Carter et al., 2018). As alternativas aos nitroimidazólicos são a furazolidona (100 mg, 2 vezes/dia, por 7 a 10 dias em adultos



A



B



C

FIGURA 8.10 Cistos de *Giardia duodenalis*. A. Representação esquemática do cisto. B e C. Cistos binucleados em amostras de fezes coradas com hematoxilina férrica. Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

e 2 mg/kg, 2 vezes/dia, por 7 a 10 dias em crianças) e o albendazol (400 mg/dia, por 5 dias em adultos, e 15 mg/kg/dia [dose máxima, 400 mg], por 5 a 7 dias em crianças) (Gardner; Hill, 2001). A nitazoxanida (400 a 500 mg/dia, 3 dias em adultos) pode ser uma alternativa em casos refratários ao tratamento com nitroimidazólicos, mas não apresenta vantagens em relação ao tratamento clássico na ausência de resistência documentada. Sugere-se realizar novos exames parasitológicos de fezes 7, 14 e 21 dias após o término do tratamento, como controle de cura.

Prevenção e controle da giardíase

Nos EUA, estima-se que 4 a 7% dos exames parasitológicos de fezes realizados em laboratórios especializados sejam positivos para *G. duodenalis*. No Brasil, observa-se uma tendência de queda pronunciada da prevalência de helmintos intestinais entre crianças ao longo das três últimas décadas, especialmente em áreas urbanas, tornando *G. duodenalis* o parasito intestinal mais comum em populações de pré-escolares (Muniz et al., 2002). A exemplo do que ocorre com os nematódeos intestinais (ver Capítulo 13, *Os Nematódeos Intestinais*), as cargas parasitárias de *Giardia* são distribuídas de modo heterogêneo em populações de hospedeiros; a maioria dos indivíduos não está infectada ou excreta pequenas quantidades de cistos, compatíveis com uma baixa carga parasitária. Poucos excretam quantidades de cistos sugestivas de grandes cargas parasitárias (Figura 8.11).

O uso de métodos moleculares para a caracterização de isolados de *G. duodenalis* possibilitou esclarecer o papel de reservatórios animais como fonte potencial de infecção humana. Existem variantes eurixenas de *G. duodenalis*, reunidas nos grupos A e B, que circulam entre seres humanos e diversos outros mamíferos. Esses parasitos têm claro *potencial zoonótico*, um importante obstáculo para o controle da giardíase humana (Feng; Xiao, 2011). A importância relativa do reservatório animal na infecção humana varia em diferentes contextos epidemiológicos. Em um surto de giardíase de veiculação hídrica

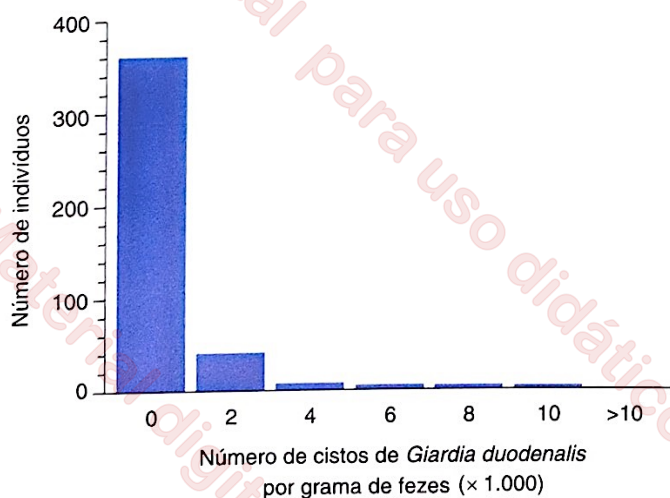


FIGURA 8.11 Distribuição de indivíduos segundo número de cistos de *Giardia duodenalis* eliminados nas fezes em duas populações brasileiras. As contagens de cistos foram expressas como número de cistos por grama de fezes. Pouco mais de 1% dos hospedeiros excretam mais de 6.000 cistos por grama de fezes, contagem sugestiva de alta carga parasitária. Adaptada de Ishida, 1995, p. 47.

no Canadá, por exemplo, a aplicação de métodos bioquímicos tornou possível incriminar esquilos como a fonte de infecção (Isaac-Renton et al., 1993). Em áreas urbanas da Austrália, (Isaac-Renton et al., 1993). Em áreas urbanas da Austrália, proporções semelhantes de cães são infectadas com variantes de *G. duodenalis* com potencial zoonótico (agrupamentos A e B) e variantes exclusivamente caninas, sugerindo a possibilidade de transmissão de *G. duodenalis* entre animais de estimação e o ser humano (Thompson, 2000).

A água é reconhecida como importante veículo para a transmissão da giardíase. Salienta-se também o papel de alimentos contaminados por manipuladores e dos insetos que atuam como *vetores mecânicos* para o transporte de cistos. Os contatos pessoa a pessoa também são relevantes na transmissão, especialmente em instituições como *creches* e *asilos*. O saneamento ambiental e o acesso à água tratada reduzem substancialmente o risco de giardíase em populações expostas (Speich et al., 2016). Entretanto, a transmissão pessoa a pessoa não se restringe necessariamente a situações em que as condições sanitárias são precárias. Explica-se assim, em parte, a persistência da giardíase em comunidades com acesso adequado a água encanada e esgoto tratado, mesmo quando os demais parasitos intestinais se tornam raros.

Existe uma vacina comercialmente disponível para a *prevenção da giardíase canina*, produzida a partir de trofozoítos inativados (Olson et al., 2000). Não se sabe a que agrupamento genético pertence o isolado utilizado em sua produção. Sua eficácia, no entanto, parece limitada. Entre os potenciais alvos para desenvolvimento de novas vacinas incluem-se a giardina α -1, as proteínas da parede do cisto e as VSP. De fato, VSPs purificadas, quando usadas como vacina, induzem imunidade protetora em cães e gatos, o que sugere um caminho promissor a ser seguido para criar novas vacinas (Serradell et al., 2016).

Balantidium coli e *Blastocystis hominis*

Dois outros protozoários intestinais patogênicos são ocasionalmente encontrados em infecções humanas: *Balantidium coli* e *Blastocystis hominis*. Ambos os agentes são membros do supergrupo Chromoalveolata (Adl et al., 2005).

Balantidium coli

Balantidium coli, encontrado em vários mamíferos, especialmente em suínos, é o único ciliado que infecta o ser humano. Foi originalmente descrito por Malmstein (1857) em pacientes com disenteria. Este protozoário cosmopolita pertence ao subgrupo Ciliophora do grupo Alveolata (Adl et al., 2005). A infecção humana é raramente observada no Brasil e na maioria dos países industrializados, embora os suínos sejam frequentemente infectados. Pode haver subdiagnóstico, pois os cistos desse protozoário são raramente encontrados nas fezes humanas e, portanto, o diagnóstico laboratorial requer o exame de amostras de fezes frescas em busca de trofozoítos (ver Capítulo 20, *Diagnóstico Parasitológico*). Os seres humanos adquirem a infecção ingerindo cistos existentes em verduras ou água contaminada com excrementos de suínos, primatas não humanos e potencialmente de roedores, cães e gatos que

albergam protozoários morfologicamente semelhantes a *B. coli* (Figura 8.12). De fato, todos os parasitos de mamíferos morfologicamente semelhantes a *B. coli*, incluindo a espécie *B. suis* encontrada em suínos, são atualmente definidos como *B. coli*, ainda que diversas outras espécies tenham sido descritas no passado. A infecção pode ser encontrada mesmo em indivíduos sem contato com suínos, como os muçulmanos. Os trofozoítos ovais são recobertos de cílios (Figura 8.12), medindo geralmente 30 a 200 μm em seu maior diâmetro. Contêm dois núcleos: um macronúcleo extremamente grande, em forma de feijão ou de rim, e um micronúcleo arredondado, bem pequeno. Os trofozoítos são liberados no intestino delgado e colonizam o intestino grosso, onde se multiplicam por fissão binária e finalmente se encistam. Embora habitem um ambiente muito pobre em oxigênio, os trofozoítos apresentam estruturas semelhantes a mitocôndrias, ainda que sem cristas ou túbulos, que parecem ser hidrogenossomos; não têm, entretanto, um complexo de Golgi típico (Schuster; Ramírez-Ávila, 2008). Apresentam um *citóstoma*, a abertura de uma invaginação da superfície celular associada à função de fagocitose, em sua porção anterior, bem como um citopígio posterior para a eliminação de resíduos não digeridos de alimentos. Encontram-se também dois vacúolos contráteis, que funcionam como organelas reguladoras de pressão osmótica no citoplasma dos trofozoítos. Os cistos, esféricos ou ligeiramente ovalados, medem geralmente 40 a 60 μm em seu maior diâmetro. Tanto trofozoítos quanto cistos são eliminados nas fezes de indivíduos infectados; são, portanto, estágios diagnósticos. Entretanto, somente os cistos, geralmente presentes em fezes formadas, são infectantes para os próximos hospedeiros. Esses estágios são sensíveis ao hipoclorito de sódio na concentração de 1%.

A maioria das infecções humanas por *B. coli* é assintomática. Em Papua Nova Guiné, por exemplo, onde as infecções de suínos são extremamente comuns, há raros relatos de doença humana por *B. coli* (Owen, 2005). Em alguns pacientes, observam-se diarreia intermitente, dor abdominal e perda de peso ou, mais raramente, uma disenteria aguda com a eliminação de fezes com sangue e muco (Bellanger et al., 2013). Nesses casos, pode haver ulceração e perfuração intestinal com disseminação do parasito, por via hematogênica, para o fígado e pulmões. Trofozoítos podem ser ocasionalmente encontrados no sedimento urinário (Maino et al., 2010). O aspecto das lesões intestinais, ao exame retossigmoidoscópico, lembra o encontrado na amebíase. As infecções tendem a ser mais graves em indivíduos imunocomprometidos, por exemplo em portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou de leucemias agudas. O diagnóstico laboratorial é feito mediante o exame parasitológico de fezes, com o achado de trofozoítos e, mais raramente, de cistos, corados com solução de Lugol, hematoxilina férrica ou tricrômico. Nas amostras de fezes diarreicas, geralmente se encontram somente trofozoítos. Sugere-se a coleta de amostras seriadas de fezes, pois a eliminação de cistos e trofozoítos pode ser intermitente. O isolamento e cultivo *in vitro* de trofozoítos a partir de amostras de fezes humanas e de animais são possíveis, mas são raramente empregados como método diagnóstico; não há produção de cistos *in vitro*.

Trata-se a balantidíase com tetraciclina na dose de 30 a 50 mg/kg/dia divididos em três tomadas (500 mg, 3 vezes/dia em adultos), durante 10 dias. Em gestantes e crianças com idade inferior a 8 anos, em que a tetraciclina é contraindicada, pode-se usar metronidazol (20 a 50 mg/kg/dia [dose máxima,

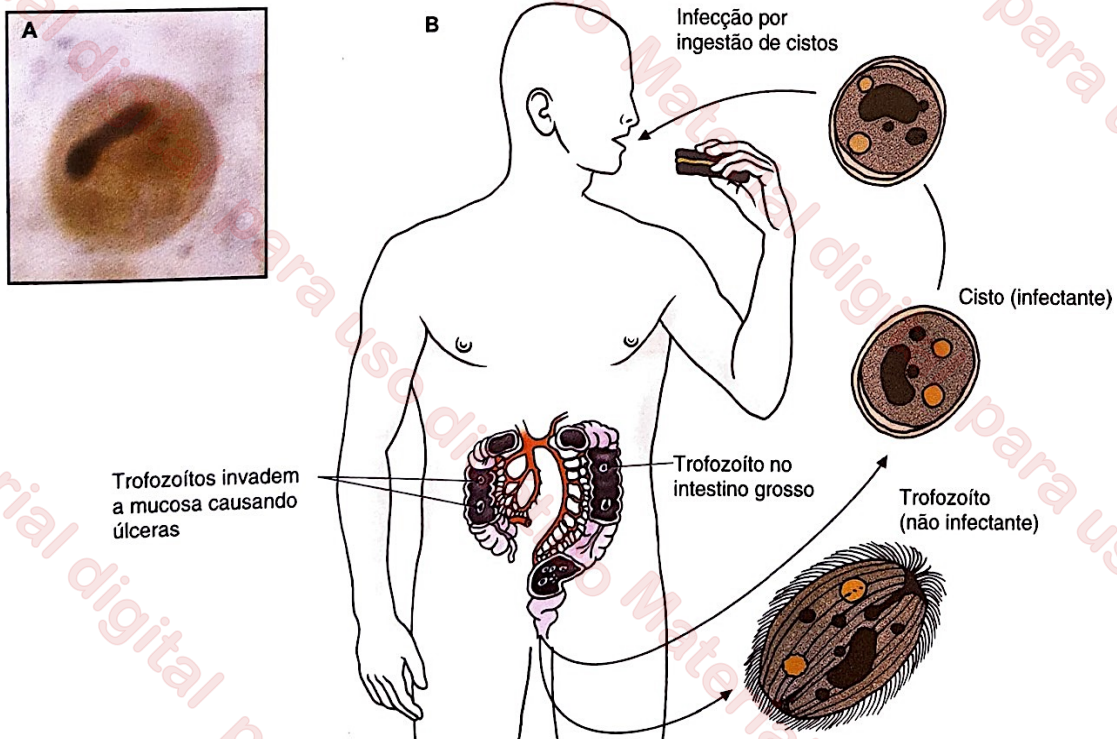


FIGURA 8.12 A. Ciclo vital de *Balantidium coli* e características morfológicas de seus trofozoítos e cistos. Os trofozoítos eliminados nas fezes diarreicas não são infectantes. B. Cisto corado com hematoxilina férrica. Fotografia de Marcelo Urbano Ferreira.

2 g] divididos em três doses) durante 5 a 7 dias. Outras alternativas terapêuticas são a paromomicina, a nitazoxanida e o iodoquinol.

Blastocystis hominis

O agrupamento Stramenopiles (Adl et al., 2005), que inclui *Blastocystis*, compreende organismos eucariotos muito diversos entre si, a maioria dos quais aeróbios e de vida livre. Entre eles, encontram-se desde algas unicelulares como as diatomáceas, componentes primários do plâncton, até algas gigantes pluricelulares e *Pythium*, um importante patógeno de plantas. *Blastocystis hominis*, originalmente descrito por Alexeieff em 1911, recebeu seu nome atual de Émile Brumpt em 1912. Apesar de ser conhecido há mais de um século, esse microrganismo anaeróbio que habita o intestino humano permanece envolto em controvérsias, especialmente quanto à sua taxonomia e patogenicidade (Stensvold; Clark, 2016).

Como a maioria dos protistas intestinais, *Blastocystis* apresenta uma forma responsável por sua transmissão a outros hospedeiros, o *cisto*, e uma forma vegetativa, o *trofozoíto*, capaz de dividir-se por fissão binária (Figura 8.13). A infecção humana por *B. hominis* é extremamente comum, mas seus trofozoítos são lisados quando colocados em contato com a água e outras soluções empregadas nos métodos de concentração mais usados para o exame parasitológico de fezes (ver Capítulo 20, *Diagnóstico Parasitológico*). Portanto, os

trofozoítos de *Blastocystis* somente são encontrados ao exame direto, sem concentração, de amostras de fezes recém-depositadas e coradas com a hematoxilina férrica, o tricrômico ou a tionina. Os cistos podem ser encontrados no exame direto ou em amostras concentradas com solução de ácido isopícnico. Os trofozoítos são extremamente pleomórficos, com estágios vacuolares que se tornam multivacuolares e ameboides, variando em tamanho entre 2 e 200 μm (Stensvold et al., 2009). Tanto as formas multivacuolares como as formas ameboides podem originar pré-cistos e cistos (Figura 8.13). Os cistos esféricos de paredes espessas, descritos detalhadamente somente nas três últimas décadas, têm de 1 a 4 núcleos e medem de 3 a 10 μm de diâmetro. Estima-se que somente 20% dos indivíduos infectados excretam cistos. Todos esses fatores sugerem que a maior parte das infecções deixe de ser diagnosticada com os exames parasitológicos de rotina. Os trofozoítos de *Blastocystis*, obtidos preferencialmente de fezes frescas, podem ser mantidos em cultivo xênico ou axênico *in vitro* (Clark; Stensvold, 2016); a cultura, entretanto, tem menor sensibilidade diagnóstica que os métodos moleculares.

A posição taxonômica de *Blastocystis* é incerta (Tan, 2008). Na classificação mais recente, situam-se entre os protozoários do supergrupo Chromoalveolata, que apresentam uma organela semelhante ao cloroplasto adquirida de um endossimbionte. Como ocorre com *G. duodenalis*, os isolados de *B. hominis* encontrados em mamíferos e aves apresentam grande diversidade genética, e são classificados

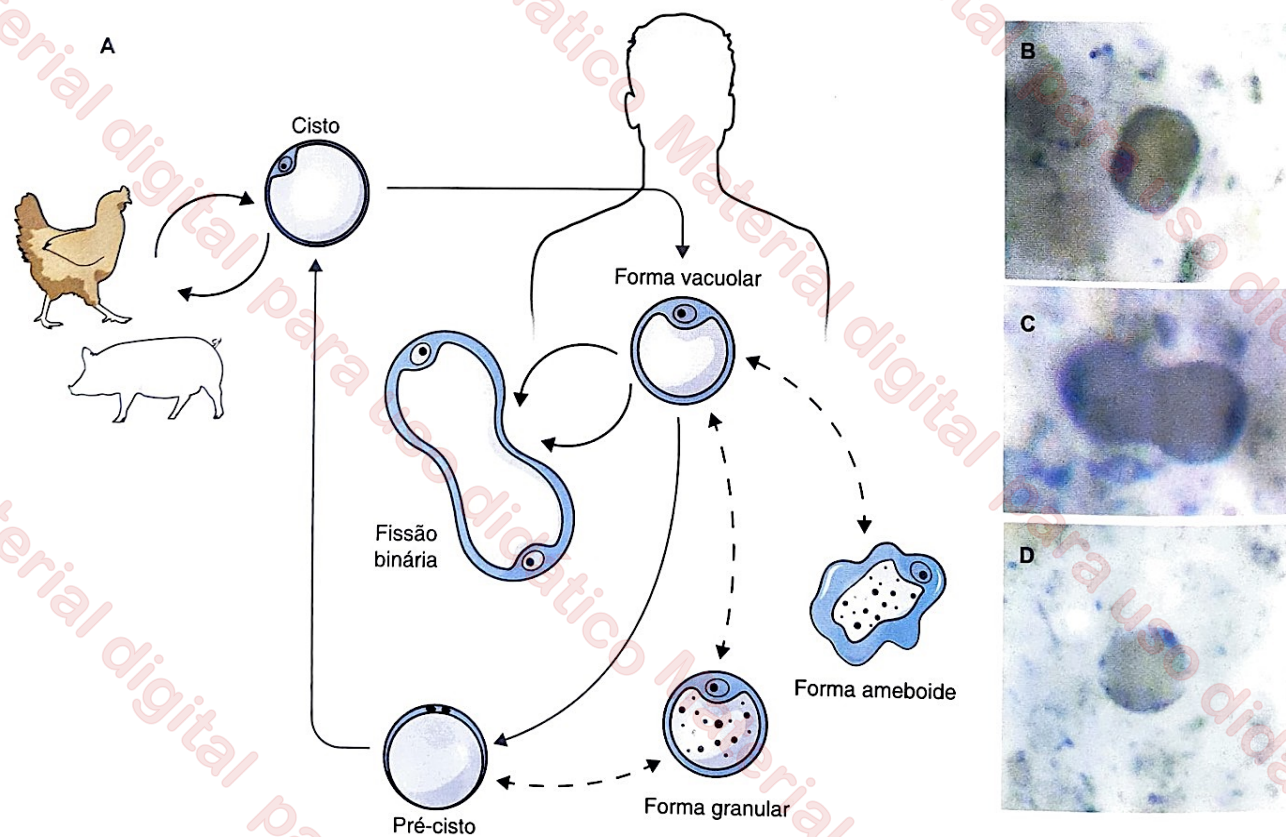


FIGURA 8.13 Ciclo vital de *Blastocystis hominis* (A) e características morfológicas de seus estágios evolutivos encontrados nas fezes, corados com hematoxilina férrica (B, C e D). Fotografias de Marcelo Urbano Ferreira.

em 17 subtipos que podem corresponder a espécies distintas com diferentes reservatórios animais (Yoshikawa et al., 2016). Diferentes subtipos (STs) são encontrados em populações humanas, mas globalmente cerca de 95% das infecções devem-se aos STs 1 (28%), 2 (11%), 3 (44%) e 4 (10%) (Stensvold; Clark, 2016). No Brasil, os dados existentes limitam-se a uma comunidade indígena do Mato Grosso onde predomina ST1 (41%), seguido de ST2 (32%) e ST3 (17%) (Malheiros et al., 2011); ST4 parece ser raro ou ausente na América do Sul, Norte da África e Oriente Médio, embora seja o segundo subtipo mais comum na Europa. Organismos semelhantes a *Blastocystis* são encontrados em diversos primatas não humanos, roedores, pássaros, répteis, anfíbios e insetos. Dos demais subtipos presentes no homem (ST4-9), somente ST9 ainda não foi encontrado em outro hospedeiro. ST10, por outro lado, é extremamente comum em bovinos, mas não foi encontrado até o momento em seres humanos, sugerindo a existência de alguma especificidade quanto ao hospedeiro. Os genomas nucleares completos dos STs 1, 4 e 7 são compactos e apresentam diversos exemplos de transferência horizontal de genes; têm menos de 19 milhões de pares de bases, com aproximadamente 6.000 genes (Gentekaki et al., 2017). O genoma circular de organelas semelhantes a mitocôndrias compreende 27 a 29 milhares de pares de bases (Stensvold; Clark, 2016).

A infecção humana ocorre mediante a ingestão de cistos (geralmente binucleados), que são eliminados de modo intermitente pelo hospedeiro e contaminam o solo, a água e vegetais consumidos pelo homem. Após o excistamento, os trofozoítos vacuolares colonizam o intestino grosso, dividem-se por fissão binária e podem dar origem a formas multivacuolares e ameboides (Figura 8.13). A infecção é crônica, com relatos de mais de 10 anos de duração (Stensvold; Clark, 2016). A presença de reprodução assexuada por esquizogonia para a formação do cisto multinucleado, frequentemente mencionada em textos didáticos, não está comprovada (Tan, 2008). Os métodos moleculares de diagnóstico mais recentemente descritos, que em geral têm como alvo a subunidade 18S do gene de rRNA do parasito, apresentam alta especificidade e detectam todos os nove subtipos que infectam o ser humano. Em comunidades de países em desenvolvimento, a quase totalidade da população encontra-se infectada, ainda que poucos tenham sintomas; em países industrializados, a infecção tende a ser menos comum. Estima-se globalmente a existência de 1 a 2 bilhões de indivíduos colonizados por esse agente.

Não há consenso quanto à patogenicidade de *B. hominis*; há quem o considere um parasito ou um comensal que habita o cólon humano sem produzir lesão significativa (Scanlan; Stensvold, 2013). Em estudos *in vitro*, os parasitos podem produzir lesões de células do epitélio intestinal, incluindo apoptose e ruptura das junções aderentes (*tight junctions*) entre essas células, resultando em aumento da permeabilidade intestinal. *Blastocystis* parece ter efeitos imunomoduladores, com degradação de IgA, inibição da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e indução da produção de diversas citocinas pró-inflamatórias por células do epitélio intestinal e macrófagos (Ajampur; Tan, 2016). Embora muitos indivíduos infectados apresentem diarreia, náuseas e vômitos, dor

abdominal, flatulência ou anorexia, é difícil se estabelecer onexo causal entre a infecção e os sintomas diante da possibilidade de coinfeção com outros patógenos gastrintestinais, também adquiridos por via orofecal. Além disso, a infecção é mais comum, em diversas populações estudadas, em indivíduos completamente assintomáticos. Em alguns inquéritos, encontra-se proporcionalmente menos infecções por *Blastocystis* entre indivíduos com sintomas de doença colônica do que entre aqueles da mesma comunidade que se mostram plenamente saudáveis. Esses dados sugerem que a presença de *Blastocystis* possa ser interpretada como um marcador de homeostase e diversidade da microbiota do trato digestório em vez de doença (Scanlan; Stensvold, 2013). Os relatos de associação entre a infecção por *Blastocystis* e a ocorrência de síndrome do cólon irritável, derivados de estudos transversais, não são conclusivos (Stensvold et al., 2009; Scanlan; Stensvold, 2013). Entretanto, indivíduos imunocomprometidos, quando infectados, parecem mais suscetíveis à doença. É possível que os parasitos de diferentes genótipos difiram quando à virulência, mas os dados disponíveis não possibilitam chegar a conclusões definitivas a este respeito. A critério médico, as infecções humanas podem ser tratadas com metronidazol, nas mesmas doses sugeridas para o tratamento da amebíase.

Outros protozoários que habitam o trato digestório humano

Existem protozoários que, embora considerados não patogênicos, podem ser encontrados no trato digestório humano:

- *Entamoeba coli*
- *Entamoeba hartmanni*
- *Entamoeba gingivalis*
- *Iodamoeba bütschlii*
- *Endolimax nana*
- *Dientamoeba fragilis*
- *Chilomastix mesnili*
- *Pentatrichomonas hominis*
- *Retortamonas intestinalis*
- *Enteromonas hominis*

Seriam, então, de acordo com alguns conceitos, comensais, pois dependem do intestino humano para sua sobrevivência. Os quatro primeiros são amebídeos e os cinco últimos, flagelados. *Retortamonas intestinalis* e *Enteromonas hominis* são de encontro raro. Existem relatos de casos de diarreia por *Dientamoeba fragilis*, mas estes são episódios autolimitados. Os indivíduos que albergam estes protozoários não devem ser tratados, mas estão potencialmente expostos à transmissão orofecal de agentes patogênicos. A Figura 8.14 ilustra as características morfológicas dos trofozoítos e dos cistos de cinco amebas comensais encontradas no trato digestório humano, comparando-as com *E. histolytica*/*E. dispar*. A Figura 8.15 ilustra a morfologia de *E. coli* e *I. bütschlii*. As características morfológicas de alguns flagelados comensais do trato digestório humano estão representadas na Figura 8.7.

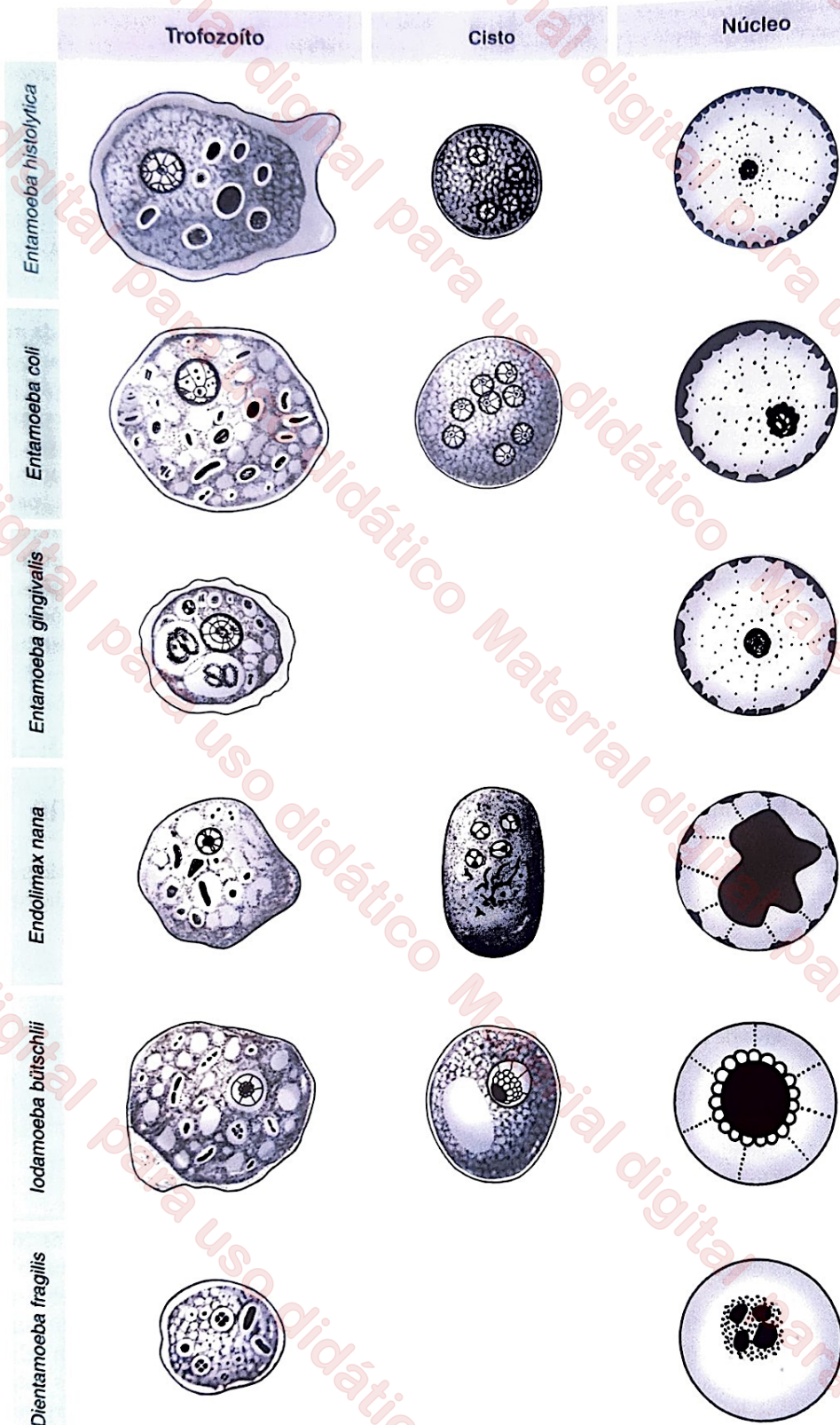


FIGURA 8.14 Representação esquemática das características morfológicas dos trofozoítos e cistos das amebas que habitam o trato digestório humano e representação esquemática dos núcleos. Com exceção de *E. gingivalis*, encontrada na cavidade oral, todas as demais espécies habitam o intestino grosso. Observa-se que os trofozoítos de *E. histolytica*/*E. dispar* apresentam nítida separação entre ectoplasma e endoplasma e podem ter hemácias semidigeridas em seu citoplasma. O núcleo dos trofozoítos e cistos (até quatro núcleos nos cistos maduros) apresentam cariossoma central e cromatina periférica delicada. O comensal *E. coli*, frequentemente encontrado em fezes humanas, apresenta trofozoítos sem separação nítida entre ectoplasma e endoplasma e sem hemácias (mas com grande quantidade de bactérias) nos vacúolos digestivos de seu citoplasma. Os núcleos apresentam cariossoma excêntrico e cromatina periférica mais grosseira e heterogeneamente distribuída. Os cistos maduros de *E. coli* apresentam oito núcleos. *Dientamoeba fragilis*, representada na figura, é atualmente considerada um flagelado. *Entamoeba hartmanni*, que não é representada na figura, apresenta essencialmente as mesmas características morfológicas de *E. histolytica*/*E. dispar*, mas distingue-se pelo menor tamanho. Seus cistos raramente chegam a 10 μm de diâmetro (média: 6 a 7 μm).

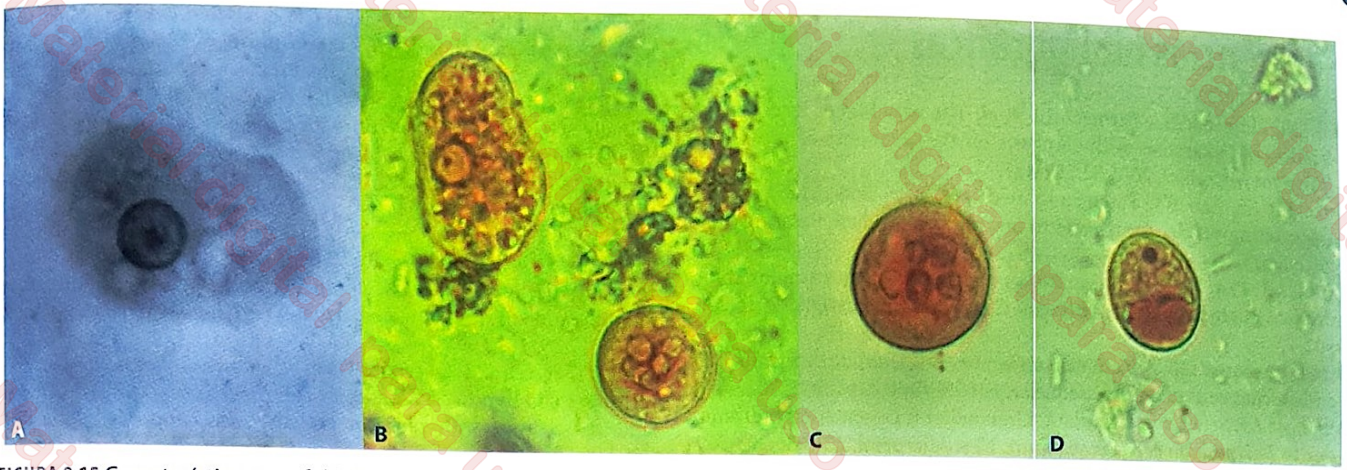


FIGURA 8.15 Características morfológicas de amebas comensais do trato digestório humano. A. Trofozoito de *Entamoeba coli* (coloração: hematoxilina férrica). B. Trofozoito e cisto multinucleado de *E. coli* (coloração: solução de Lugol). C. Cisto multinucleado de *E. coli* (coloração: solução de Lugol). D. Cisto de *Iodamoeba bütschilii* (coloração: solução de Lugol). Fotografias de Cláudio Santos Ferreira.

PARASITOLOGIA EM FOCO

Variação antigênica em *Giardia*

Variação antigênica é o mecanismo pelo qual uma linhagem clonal de microrganismos expressa sucessivamente formas alternativas de um antígeno sem alterações de genótipo. É um fenômeno bem conhecido em plasmódios e em tripanossomas africanos. *Giardia* compartilha com os demais organismos unicelulares que apresentam variação antigênica as seguintes características: (i) seu genoma apresenta uma grande família de genes homólogos que codificam antígenos de superfície imunodominantes; (ii) existe um mecanismo de regulação de expressão que torna possível que um único membro dessa família seja expresso em cada célula individual; (iii) esse mecanismo de regulação viabiliza a troca (ou *switching*) de gene a ser expresso (Gargantini et al., 2016).

Em *Giardia*, as primeiras evidências de variação antigênica foram obtidas *in vitro* em experimentos realizados em meados da década de 1980. Linhagens de *G. duodenalis* mantidas em cultivo axênico variavam, ao longo do tempo, os determinantes antigênicos expressos na superfície dos trofozoítos, abolindo seu reconhecimento por alguns anticorpos monoclonais (Nash; Aggarwal, 1986). A variação antigênica foi interpretada como um mecanismo adaptativo que possibilita ao parasito a flexibilidade fenotípica necessária para sobreviver em um ambiente hostil como o intestino delgado, para infectar diferentes hospedeiros e para escapar da resposta imune desenvolvida por esses hospedeiros. Pouco depois, demonstrou-se a ocorrência de variação antigênica em infecções experimentais humanas (Nash et al., 1990).

As proteínas de superfície de *Giardia* que sofrem variação antigênica são conhecidas como *variant surface proteins* (proteínas variantes de superfície), ou VSP. Trata-se de uma família de proteínas altamente imunogênicas, glicosiladas e ricas em cisteína, com massa molecular entre 20 e 200 kDa. O genoma de *G. duodenalis* contém cerca de 200 genes *vsp*. Os RNA mensageiros (mRNAs) de todos esses genes são transcritos continuamente em trofozoítos de *Giardia*, mas apenas uma variante é expressa na superfície de cada trofozoito, o que sugere a existência de um mecanismo muito eficiente de controle de sua expressão. Os trofozoítos de *Giardia* são binucleados, com ambos os núcleos apresentando transcrição igualmente ativa. Portanto, se a expressão de VSP fosse controlada em nível transcricional, o mecanismo de controle teria de agir de modo coordenado nos dois núcleos. Sabe-se hoje, no entanto, que a regulação da expressão de VSP ocorre em nível pós-transcricional, no citoplasma da célula, e envolve *pequenos RNAs* (sRNAs), que fazem parte de uma família de RNAs regulatórios, não codificadores, derivados de RNAs de dupla fita.

Há essencialmente *dois mecanismos* propostos para o controle de expressão de VSP por meio de silenciamento dependente de sRNA. O primeiro envolve

moléculas análogas ao RNA de interferência (RNAi). Diversas VSP seriam transcritas nos núcleos de um trofozoito e transportadas para o citoplasma. Esses transcritos são reconhecidos por uma RNA polimerase dependente de RNA, que somente é ativa quando mais de um transcrito de VSP está presente. Essa enzima cataliza a síntese de transcritos complementares, com pareamento de fitas e a formação de complexos de RNA de dupla fita. Esses complexos são alvos de RNA endonucleases que reconhecem RNA de dupla fita, com a produção de pequenas moléculas de RNA resultantes da clivagem do RNA mensageiro transcrito, mas não traduzido, de VSP. Essas pequenas moléculas, análogas ao RNA de interferência que controla a expressão de genes em geral, ligam-se especificamente a alguns transcritos de VSP e impedem sua tradução. A única VSP transcrita é aquela para a qual não existem transcritos complementares e, conseqüentemente, não foram produzidas moléculas de RNA de interferência.

O segundo mecanismo envolveria uma centena de microRNAs (miRNAs) de 24 a 28 nucleotídeos, com múltiplos alvos específicos nos transcritos dos genes *vsp* (Saraiya et al., 2014). Cada um desses miRNAs é capaz de reprimir parcialmente a tradução do gene *vsp* correspondente; a ação combinada de vários miRNAs sobre o mesmo mRNA proporciona inibição completa da tradução. Portanto, o silenciamento de expressão de um gene *vsp* resultaria da ligação simultânea de vários miRNAs a alvos específicos na fita de mRNA. Entretanto, ainda não se sabe como um único transcrito é capaz de escapar do mecanismo de silenciamento de tradução; uma hipótese a ser investigada é a de que a probabilidade de um transcrito específico de VSP a ser traduzido depende de sua abundância relativa. O fenômeno de variação antigênica também ocorre *in vitro*, sem pressão exercida pelo sistema imune do hospedeiro, mas não se conhecem os sinais que desencadeiam a troca periódica de VSP a ser expressa.

Referências bibliográficas

- Gargantini PR, Serradell MC, Ríos DN et al. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 32:52-8.
- Nash TE, Aggarwal A. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *J Immunol*. 1986;136:2628-32.
- Nash TE, Herrington DA, Levine MM et al. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J Immunol*. 1990;144:4362-9.
- Saraiya AA, Li W, Wu J et al. The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1003791.

Referências bibliográficas

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52:399-451.
- Ajjampur SS, Tan KS. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. – Interpreting results from *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasitol Int.* 2016;65:772-9.
- Bartelt LA, Platts-Mills JA. *Giardia*: a pathogen or commensal for children in high-prevalence settings? *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29:502-7.
- Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep.* 2015;7:62.
- Bellanger AP, Scherer E, Cazorla A, Grenouillet F. Dysenteric syndrome due to *Balantidium coli*: a case report. *New Microbiol.* 2013;36:203-5.
- Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut.* 2007;56:316-7.
- Cacciò SM, Lalle M, Svärd SG. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infect Genet Evol.* 2018;66:335-45.
- Cacciò SM, Sprong H. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol.* 2010;124:107-12.
- Carter ER, Nabarro LE, Hedley L, Chiodini PL. Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:37-42.
- Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis*: Isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. *Curr Protoc Microbiol.* 2016;43:20A.1.1-20A.1.8.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* 1993;40:340-34.
- Donowitz JR, Alam M, Kabir M et al. A prospective longitudinal cohort to investigate the effects of early life giardiasis on growth and all cause diarrhea. *Clin Infect Dis.* 2016;63:792-7.
- Einarsson E, Maayah S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol.* 2016;34:47-52.
- Elsheikha HM, Regan CS, Clark CG. Novel *Entamoeba* findings in non-human primates. *Trends Parasitol.* 2018;34:283-94.
- Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:110-40.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N et al. 2007. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:511-32.
- Gentekaki E, Curtis BA, Stairs CW et al. Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biol.* 2017;15:e2003769.
- Gonzales ML, Dans LF, Martinez EG. Antiamoebic drugs for treating amoebic colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;2:CD006085.
- Isaac-Renton J, Cordeiro C, Sarafis K, Shahriari H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis.* 1993;167:431-40.
- Heredia RD, Fonseca JA, López MC. *Entamoeba moshkovskii* – perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amoebiasis. *Acta Trop.* 2012;123:139-45.
- Ishida MMI. A coprosocopia no diagnóstico da giardiase. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.
- Loftus B, Anderson I, Davies R et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature.* 2005;433:865-8.
- Lorenzi HA, Puiu D, Miller JR et al. New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e716.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380:2095-128.
- Mai Z, Ghosh S, Frisardi M et al. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ('crypton') in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol.* 1999;19:2198-205.
- Maino A, Garigali G, Grande R et al. Urinary balantidiasis: diagnosis at a glance by urine sediment examination. *J Nephrol.* 2010;23:732-7.
- Malheiros AF, Stensvold CR, Clark CG et al. Short report: Molecular characterization of *Blastocystis* obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:1050-3.
- McInally SG, Dawson SC. Eight unique basal bodies in the multi-flagellated diplomonad *Giardia lamblia*. *Cilia.* 2016;5:21.
- Minetti C, Chalmers RM, Beeching NJ, Probert C, Lamden K. Giardiasis. *BMJ.* 2016;355:i5369.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 2009;25:93-100.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 2007;317:1921-6.
- Muniz PT, Ferreira MU, Ferreira CS et al. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002;96:503-12.
- Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA, Levine MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis.* 1987;156:974-84.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW. *Giardia* vaccination. *Parasitol Today.* 2000;16:213-7.
- Ortega-Pierres MG, Jex AR, Ansell BR, Svärd SG. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Trop.* 2018;184:67-72.
- Owen IL. Parasitic zoonoses in Papua New Guinea. *J Helminthol.* 2005;79:1-14.
- Piva B, Benchimol M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell.* 2004;96:735-46.
- Ralston KS. Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* 2015;31:442-52.
- Ramesh MA, Malik SB, Logsdon Jr JM. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Curr Biol.* 2005;15:185-91.
- Roxtröm-Lindquist K, Palm D, Reiner D et al. *Giardia* immunity – an update. *Trends Parasitol.* 2006;22:26-31.
- Royer TL, Gilchrist C, Kabir M et al. *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1543-5.
- Sargeant PG, Williams JE, Greene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978;72:519-21.
- Scanlan PD, Stensvold CR. *Blastocystis*: getting to grips with our guileful guest. *Trends Parasitol.* 2013;29:523-9.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* 2006;22:203-8.
- Schuster FL, Ramírez-Ávila L. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:626-38.
- Serradell MC, Saura A, Rupil LL et al. Vaccination of domestic animals with a novel oral vaccine prevents *Giardia* infections, alleviates signs of giardiasis and reduces transmission to humans. *NPJ Vaccines.* 2016;1:16018.
- Singh RS, Walia AK, Kanwar JR, Kennedy JF. Amoebiasis vaccine development: A snapshot on *E. histolytica* with emphasis on perspectives of Gal/GalNAc lectin. *Int J Biol Macromol.* 2016;91:258-68.
- Soares R, Tasca T. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *J Microbiol Methods.* 2016;129:98-102.
- Speich B, Croll D, Fürst T et al. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:87-99.
- Stanley Jr SL. Vaccines for amoebiasis: Barriers and opportunities. *Parasitology.* 2006;133:S81-S86.
- Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol.* 2009;25:23-9.
- Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:639-65.
- Tawari B, Ali IK, Scott C et al. Patterns of evolution in the unique tRNA gene arrays of the genus *Entamoeba*. *Mol Biol Evol.* 2008;25:187-98.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol.* 2000;30:1259-67.
- Tovar J, Fischer A, Clark CG. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* 1999;32:1013-21.

- Tovar J, León-Ávila G, Sánchez LB et al. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 2003;426:172-6.
- Troeger H, Epple HJ, Schneider T et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*. 2007;56:328-35.
- Watanabe K, Petri Jr WA. Molecular biology research to benefit patients with *Entamoeba histolytica* infection. *Mol Microbiol*. 2015;98:208-217.
- Willhoeft U, Tannich E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;99:41-53.
- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis: Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull*. 1997;18:13-4.

- Yoshikawa H, Koyama Y, Tsuchiya E, Takami K. *Blastocystis* phylogeny among various isolates from humans to insects. *Parasitol Int*. 2016;65:750-9.

Leitura sugerida

- Marie C, Petri Jr WA. Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:493-520.
- Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol* 2016;34:47-52.
- Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitol Int*. 2016;65:763-71.