

Maria Carolina Marques Cravo

Desenvolvimento de vacinas contra *Giardia lamblia*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Carolina Marques Cravo

Desenvolvimento de vacinas contra *Giardia lamblia*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Maria Carolina Marques Cravo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2011149053, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, _____ de _____ de 2016.

(Maria Carolina Marques Cravo)

Tutora da Monografia

(Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa)

Aluna

(Maria Carolina Marques Cravo)

Aqui deixo os meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues Sousa que, desde o primeiro momento, se mostrou disponível para me orientar e transmitir conhecimentos, pelo tempo que disponibilizou e pela paciência.

Aos meus amigos e colegas de curso pela amizade, horas de riso e apoio.

Ao meu namorado Sérgio Azevedo pelo incentivo, compreensão e paciência durante todo este período.

E em especial aos meus pais e irmãos por todo o carinho, compreensão e apoio, por acreditarem em mim e estarem sempre presentes na minha vida, aos quais não existem palavras nem forma de agradecimento que demonstrem a minha enorme gratidão.

RESUMO

Giardia spp. é um protozoário que habita o intestino delgado superior de mamíferos e outras espécies, sendo o agente etiológico da giardíase. A eliminação de *Giardia* a partir de um hospedeiro requer ambos os mecanismos efetores de imunidade inata e adaptativa. A terapia antimicrobiana é usada normalmente no controlo da infeção mas nem sempre é eficaz e a resistência a fármacos tornou-se uma preocupação crescente. Foram descritas diversas proteínas de *Giardia* que estimulam respostas imunes humorais e celulares. Proteínas variáveis de superfície, α 1-giardina e proteína 2 da parede do quisto podem induzir respostas protetoras do hospedeiro a futuras infeções por *Giardia*. A caracterização e avaliação do potencial de proteção das proteínas imunogénicas associadas à *Giardia*, oferecerá novos conhecimentos sobre as interações parasita-hospedeiro e pode auxiliar no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o parasita.

ABSTRACT

Giardia spp. is a protozoan parasite that inhabits the upper small intestine of mammals and other species and is the aetiological agent of giardiasis. The clearance of *Giardia* from a host requires both innate and adaptive immunity effector mechanisms. Antimicrobial therapy is commonly used in the control of infection but not always is effective and drug resistance has become an increasing concern. Several *Giardia* proteins that stimulate humoral and cellular immune responses have been described. Variant surface proteins, α 1-giardin and cyst wall protein 2 can induce host protective responses to future *Giardia* challenges. The characterization and evaluation of the protective potential of the immunogenic proteins that are associated with *Giardia* will offer new insights into host–parasite interactions and may aid in the development of an effective vaccine against the parasite.

PALAVRAS-CHAVE

Giardia lamblia, imunidade, antígenos, anticorpos, vacinas, VSPs, CWP2, α 1-giardina.

ABREVIATURAS

ADI – “arginine deaminase”

ADN – ácido desoxirribonucleico

AMP – “antimicrobial peptide”

BIP – “binding immunoglobulin protein”

Breg – B reguladora

CWP – “cyst wall protein”

DC – “dendritic cell”

FBA – “fructose-1,6-biphosphate aldose”

GI – gastrointestinal

HSP – “heat-shock protein”

IEL – “intra-epithelial lymphocyte”

Ig – inmunoglobulina

IL – interleucina

MHC-II – molécula MHC classe II

NIs - nitroimidazóis

NO – “nitric oxide”

OCT - ornitina carbamoiltransferase

PP - placa de Peyer

RNAi – RNA interferente

TBV – “transmission blocking vaccine”

Treg – T reguladora

VSPs – “variant surface protein”

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	2
Figura 2. Trofozoíto (A) e quisto (B) de <i>G. lamblia</i>	3
Figura 3. Mecanismos de defesa do hospedeiro contra <i>G. lamblia</i>	5
Figura 4. Representação esquemática da estrutura de uma VSP de <i>Giardia</i>	8
Tabela I. Principais proteínas imunogénicas de <i>G. lamblia</i>	7

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Resposta imune de infecções por <i>Giardia</i>	4
2.1. Mecanismos de imunidade inata e adaptativa	4
3. Proteínas imunogénicas de <i>Giardia</i>	6
4. Tratamento, prevenção e controlo de <i>Giardia</i>	10
5. Vacinas contra <i>G. lamblia</i>	11
5.1. Fase alvo	12
6. Importância do desenvolvimento de vacinas	13
7. Estratégias de desenvolvimento de vacinas	13
7.1. Estudos com VSPs	14
7.2. Estudos com <i>Streptococcus gordonii</i> expressando CWP2	15
7.3. Estudos com α I-giardina	16
7.4. Estudos com α -enolase	17
7.5. Estudos com vetores atenuados de <i>Salmonella</i>	17
8. Perspetivas futuras	18
9. Conclusão	19
10. Referências	20

I. INTRODUÇÃO

Giardia spp. é um protozoário flagelado binucleado, que vive e se reproduz no intestino delgado de um conjunto diversificado de espécies de vertebrados^(1,2). Este parasita é o agente etiológico da giardíase, uma das doenças gastrointestinais (GI) mais comuns a nível mundial⁽¹⁾. A giardíase é mais prevalente nos países em desenvolvimento; nestes, exibe uma prevalência muito variável que vai de 1% a 50%, enquanto nos países desenvolvidos varia entre 0.4% a 7%. As manifestações clínicas da doença variam de assintomáticas a diarreia aguda ou crónica com dores abdominais, flatulência, náuseas, vômitos, perda de peso, lesões intestinais e síndrome de má absorção que pode durar vários meses⁽¹⁻⁴⁾. O tempo de incubação antes do desenvolvimento sintomático da doença varia entre 1 a 4 semanas (média, 10 dias)⁽⁵⁾.

Os fatores de risco associados a infeções com *Giardia* incluem más condições sanitárias, viagens a áreas endémicas, consumo de água inadequadamente tratada, creches, e práticas sexuais oral-anal^(5,6). As infeções podem ocorrer em formas de surto e epidemias dentro de creches e outros ambientes institucionais, e entre familiares de crianças infetadas. Um cuidado escrupuloso na lavagem das mãos e tratamento de todos os indivíduos infetados são importantes no controlo da propagação da infeção.

Giardia tem um ciclo de vida relativamente simples (Figura 1) que consiste em duas fases diferentes de desenvolvimento estrutural e bioquímico: o trofozoíto (forma vegetativa), que coloniza o intestino do hospedeiro e o quisto (forma infetante) que é resistente a condições ambientais (Figura 2)^(1,2,5,6). A dose mínima infeciosa para os humanos estima-se que seja de 10 a 25 quistos⁽⁵⁾. O ambiente ácido do estômago induz um processo de desenquistamento no qual um quisto gera dois trofozoítos, que vão posteriormente colonizar o intestino delgado proximal sem invadir o epitélio⁽¹⁾. Os trofozoítos são resistentes à eliminação via fluxo de massa no lúmen intestinal, porque podem ligar-se ao epitélio intestinal. Quando os trofozoítos migram para o trato GI inferior, encontram mudanças no ambiente incluindo pH, níveis de bÍlis e colesterol que desencadeiam o enquistamento. Os quistos são depois libertados do hospedeiro através das fezes, e o ciclo de transmissão é completo mediante infeção por quistos de um novo hospedeiro.

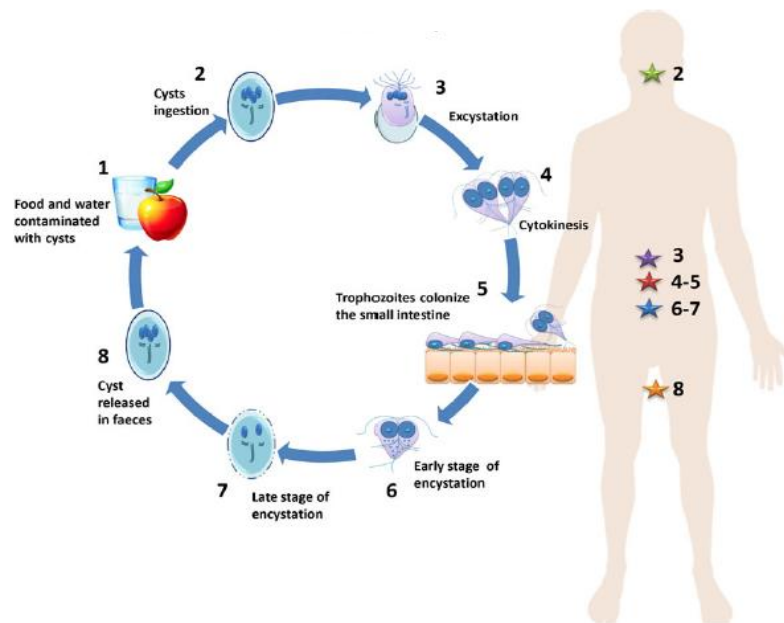


Figura I. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*⁽¹⁾. A infecção por *Giardia* começa com a ingestão de comida e água contaminadas com quistos (1 e 2). A exposição ao ambiente ácido do estômago induz o processo de desenquistamento (3). Cada quisto origina dois trofozoítos (4). Os trofozoítos colonizam e replicam no intestino delgado, podendo ligar-se ao epitélio intestinal (5). Estes deslocam-se ao longo do intestino; o ambiente baixo em colesterol, alto em bilis e ligeiramente alcalino pode induzir a fase inicial de enquistamento (6). O disco adesivo separa-se e a célula sofre replicação de ADN, mantendo a célula com dois núcleos. Durante a fase tardia de enquistamento os dois núcleos dividem-se, originando quatro núcleos (7). Os quistos são posteriormente eliminados nas fezes (8).

O género *Giardia* é constituído por seis espécies; destas, apenas *G. lamblia* (também designada de *G. intestinalis* ou *G. duodenalis*) pode infetar os seres humanos, além de vários outros mamíferos⁽¹⁾. Foi descoberta pela primeira vez em 1681 por Antonie van Leeuwenhoek, que a encontrou nas suas próprias fezes⁽⁷⁾. A espécie *G. muris* é encontrada em roedores, *G. agilis* em anfíbios, *G. psittaci* em periquitos, *G. ardae* em garças e *G. microti* em rato-almiscarado⁽¹⁾.

Estudos genómicos confirmaram que existem oito genótipos de *G. lamblia* [A-H]^(1,4,6). Sabe-se que os genótipos A e B infetam os seres humanos, apesar do genótipo B ser o mais frequente mundialmente. Os genótipos que não infetam o homem incluem os genótipos C e D que infetam cães, genótipo E que infeta animais biungulados, genótipo F que infeta gatos, genótipo G que infeta roedores, e genótipo H que infeta focas⁽¹⁾. No entanto, apenas os genótipos A, B e E podem ser eficientemente cultivados *in vitro*.

A giardíase torna-se uma doença autolimitada em mais de 85% dos indivíduos infectados, indicando a existência de mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasita^(1,4,6). Curiosamente, casos de giardíase crônica foram documentados mesmo em indivíduos imunocompetentes.

Vários fatores têm sido propostos para explicar a variabilidade da doença, incluindo o estado do sistema imunitário do hospedeiro e a idade, tipo de genótipo, dose infecciosa e, eventualmente, coinfeções⁽³⁾. As consequências fisiopatológicas da infecção por *Giardia* são claramente multifatoriais, e envolvem fatores do hospedeiro e do parasita, assim como processos imunológicos das mucosas e não imunológicos.

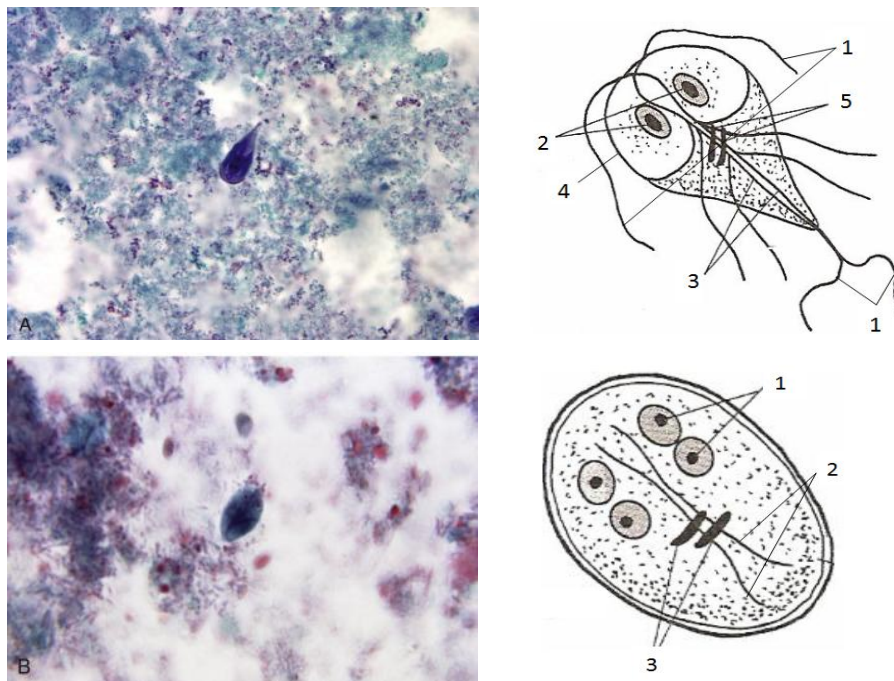


Figura 2. Trofozoíto (A) e quisto (B) de *G. lamblia*⁽⁵⁾. O trofozoíto tem 9 a 12 μm de comprimento e 5 a 15 μm de largura. Estão presentes 4 pares de flagelos livres (1), dois núcleos com cariossoma central (2), duas fibras longitudinais ou axóstilos (3), um disco ventral ou suatorial para adesão do parasita às vilosidades do intestino (4), e dois corpos parabasais retangulares abaixo do núcleo (5). Os quistos são pequenos, 8 a 12 μm de comprimento e 7 a 10 μm de largura. Estão presentes 4 núcleos (1), flagelos intracitoplasmáticos (2) e corpos parabasais em forma de vírgula (3).

2. RESPOSTA IMUNE DE INFEÇÕES POR *Giardia*

A investigação sobre *Giardia* tem expandindo-se muito nos últimos anos, e a compreensão sobre a sua patofisiologia e imunologia é cada vez maior⁽⁴⁾. No pico da infecção, os trofozoítos de *Giardia* induzem respostas patofisiológicas que culminam no desenvolvimento da doença diarreica. Contudo, resultados em humanos sugerem que a mucosa intestinal de indivíduos infetados é desprovida de sinais evidentes de inflamação intestinal, o mesmo acontecendo em modelos animais. Assim, a compreensão sobre as respostas inflamatórias do hospedeiro ao parasita permanecem pouco conhecidas, e os estudos feitos em humanos juntamente com os dados experimentais têm tido resultados contraditórios. Atualmente, é também perceptível que determinadas infecções por *Giardia* contêm mecanismos capazes de modular as respostas imunológicas do hospedeiro. Como a infecção por via oral é compartilhada com muitos outros patogénicos GI, podem ocorrer muitas vezes coinfeções, especialmente em locais com mau saneamento e/ou tratamento inadequado da água de beber. Além disso, as infecções por *Giardia* podem modular as respostas imunológicas do hospedeiro e proteger contra o desenvolvimento de doenças diarreicas nos países em desenvolvimento.

2.1. MECANISMOS DE IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA

O sistema imunitário da mucosa intestinal é extremamente complexo, pois pode reconhecer e distinguir entre antigénios de alimentos, bactérias comensais e patogénios, e ainda responder adequadamente aos patogénios via mecanismos inatos e adaptativos⁽¹⁾. Uma vez que *G. lamblia* não invade a camada epitelial, causa pouca ou nenhuma inflamação da mucosa. Embora o conhecimento atual sobre os mecanismos de imunidade de *Giardia* seja limitado, vários estudos produziram avanços significativos na compreensão da resposta inata e adaptativa do hospedeiro contra o parasita (Figura 3).

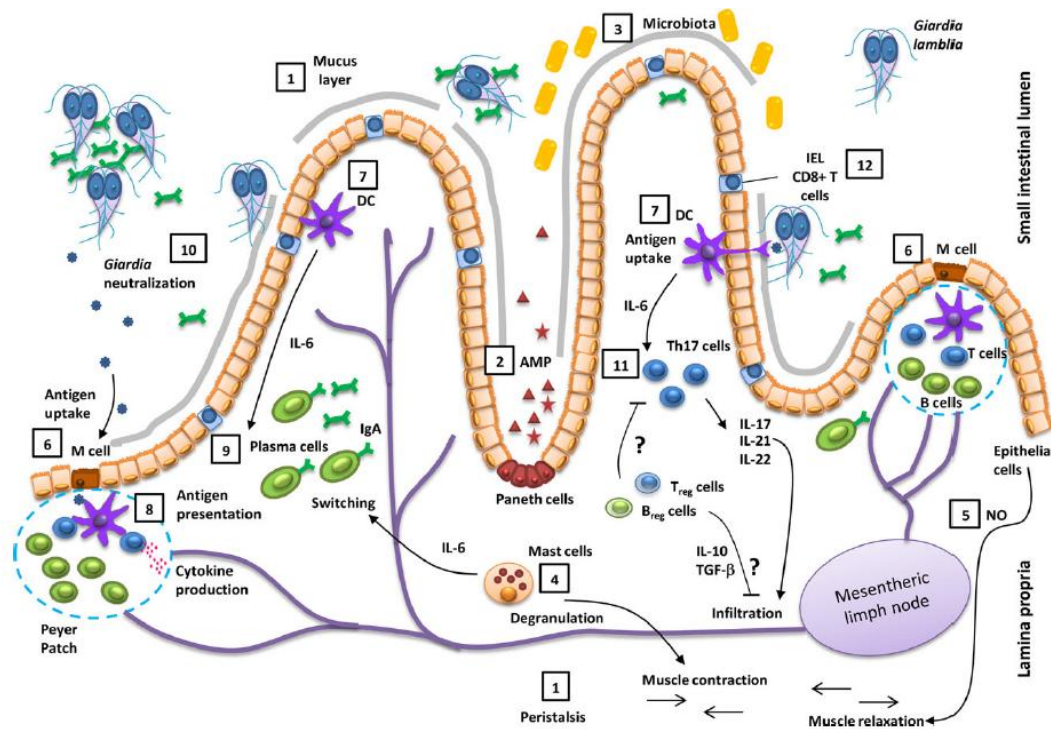


Figura 3. Mecanismos de defesa do hospedeiro contra *G. lamblia*⁽¹⁾. Os sistemas de imunidade inata e adaptativa atuam em sincronia para controlar a infecção por *Giardia*. Mecanismos de imunidade inata são a primeira linha de defesa contra a colonização por *Giardia*. A camada de muco na superfície intestinal e os movimentos peristálticos constituem barreiras mecânicas à ligação de *Giardia* (1). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) libertados pelas células de Paneth e outras, podem matar os trofozoítos (2). O microbiota intestinal tem um efeito anti-*Giardia* por competição, toxicidade direta ou modulação da resposta imune; além disso, contribui para preservar a integridade intestinal (3). Os mastócitos liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 6 (IL-6); a desgranulação dos mastócitos promove o peristaltismo (4). O epitélio intestinal e as células imunes produzem óxido nítrico (NO), que tem um efeito citostático nos trofozoítos de *Giardia*, inibe os processos de desenquistamento/enquistamento e contribui para o peristaltismo (5). As células M captam, por endocitose, antígenos do lúmen intestinal para dentro de placas de Peyer (PPs) para induzir respostas imunes (6). As células dendríticas (DCs) desempenham um papel como um “conector” entre a imunidade inata e adaptativa. Encontram-se localizadas na lâmina própria e PPs onde podem reconhecer antígenos; podendo também expandir as suas dendrites para dentro do lúmen intestinal para captar antígenos (7). As DCs fagocitam e processam antígenos de *Giardia* para apresentação posterior a células T naïve por moléculas MHC classe II (MHC-II). Células T ativadas liberam um painel de citocinas, que modulam a resposta anti-*Giardia* (8). IL-6 libertada pelos mastócitos, DCs ou células T é um modulador importante da maturação das células B, e induz a troca de classe de anticorpo para produzir imunoglobulina A (IgA) (9). Os plasmócitos migram para a lâmina própria libertando IgA, que pode inibir a ligação de *Giardia* às células intestinais epiteliais (10). As células Th17 e T CD4⁺ são ativadas durante o início da imunidade adaptativa contra *Giardia*, e liberam citocinas tais como IL-17, IL-21, IL-22, que desempenham um papel pró-inflamatório (11). Os linfócitos intra-epiteliais (IEL) são principalmente células T CD8⁺ e desempenham um papel na doença patológica do intestino durante a giardíase (12).

Numerosas questões permanecem sem resposta⁽¹⁾. Por exemplo, quais os papéis que estão a ser desempenhados pelas células Breg e Treg na regulação do processo inflamatório durante a infeção por *Giardia*? Como podem os antigénios parasitários induzir eficientemente respostas imunes locais e sistémicas quando não invadem a mucosa? Como é que a infeção por *Giardia* pode quebrar a tolerância da mucosa? Que antigénios de *Giardia* podem induzir uma resposta imune protetiva? Estudos futuros são necessários para compreender plenamente a interação hospedeiro-*Giardia* e as defesas imunológicas do hospedeiro que controlam e eliminam a infeção por *Giardia*.

3. PROTEÍNAS IMUNOGÉNICAS DE *Giardia*

Pouco se sabe sobre quais são os antigénios de *Giardia* que estimulam respostas imunes eficazes^(1,2). É importante continuar a aumentar o nosso conhecimento sobre as proteínas imunogénicas de *Giardia*, que podem induzir respostas imunogénicas humorais e celulares protetivas do hospedeiro. Apesar da importância de ambas as células T e B na imunidade anti-*Giardia*, a maioria dos estudos direcionou-se para as proteínas que são reconhecidas pela resposta humoral (Tabela I).

As principais proteínas que foram identificadas como antigénios alvo diferem na sua função e localização no parasita e incluem os seguintes antigénios imunogénicos: proteínas variáveis de superfície (VSPs), giardinas, tubulinas (proteínas do citoesqueleto), proteínas de choque térmico (HSPs), proteínas da parede do quisto (CWPs) e proteínas relacionadas com o metabolismo do parasita, tal como α -enolase, frutose-1,6-bifosfato aldolase (FBA), arginina deaminase (ADI) e ornitina carbamoiltransferase (OCT), entre outras^(1,2). A primeira análise proteómica realizada para *Giardia* descreveu 16 proteínas imunorreativas que foram identificadas pelo soro (IgG) de indivíduos infetados⁽¹⁾. Estudos adicionais observaram resultados semelhantes quando foram analisados anticorpos IgA secretores de pacientes infetados. Num estudo utilizando um modelo de infeção por *Giardia* em ratos C3H-hej, descreveu-se um grupo de bandas de proteínas que foram reconhecidos por anticorpos secretores e sistémicos. Durante a infeção primária, as bandas reconhecidas corresponderam a proteínas de 63, 71 e 86 kDa, enquanto durante a infeção secundária, proteínas adicionais foram detetadas (48, 55, 106 e 159 kDa). Estas alterações no padrão de reconhecimento de anticorpos podem ser devidas à variação antigénica do parasita.

Contudo, experiências adicionais são necessárias para avaliar o papel protetor destas proteínas e a sua caracterização a nível molecular.

Tabela I. Principais proteínas imunogénicas de *G. lamblia*⁽¹⁾.

Name	Molecular weight (kDa)	Localization	Protective immunity
Structural proteins			
α -1-Giardin	32	Ventral disc	Yes
α -2-Giardin	33	Ventral disc	NE
α -7.3-Giardin	33	Ventral disc	NE
α -7.1-Giardin	43*	Ventral disc	NE
α -11-Giardin	35	Ventral disc	NE
SALP-1	27	Ventral disc	NE
β -Giardin	27	Cytoskeleton	NE
α -2-Tubulin	50*	Cytoskeleton	NE
β -Tubulin	55	Cytoskeleton	NE
GHSP-115	115	Intracellular	NE
Metabolism proteins			
ADI	64*	Intracellular	NE
OCT	33.5	Intracellular	NE
FBA	37	Intracellular	NE
UPL-1	38	Intracellular	NE
Enolase	50	Intracellular	NO
Variant surface proteins			
VSPH7	57*	Membrane	NE
VSP9B10, VSP1267, VSPA6, VSPS1, VSPS2, VSPS7, VSPS12 and VSPS6 ^a	39-76	Membrane/Intracellular	Yes
TSA 417	25	Membrane	NE
Heat-shock proteins			
BIP	71	ER/ESV	NE
Cyst proteins			
CWP1	26	ESV	NE
CWP2	39	Cyst wall	Yes
Others			
GTA-1	20		NE
GTA-2	27	Intracellular	NE

^aExpressão simultânea por interrupção da variação antigénica. NE, não avaliado; SALP, “striated fibre-assembling-like protein”; GHSP-115, “*Giardia* head stalk protein 115”; ADI, arginina deaminase; OCT, ornitina carbamoiltransferase; FBA, frutose-1,6-bifosfato aldolase; UPL-1, uridina fosforilase; VSP, proteína variável de superfície; TSA, antigénio de superfície do trofozoíto; BIP, proteína de ligação de imunoglobulinas; CWP, proteína da parede do quisto; GTA, antigénio do trofozoíto de *Giardia*; ESV, vesículas específicas de enquistamento; ER, retículo endoplasmático.

*Dados obtidos a partir do banco de dados de *Giardia* (www.giardiadb.org)⁽¹⁾

As VSPs são proteínas ricas em cisteína com massas moleculares que variam entre 20 a 200 kDa^(1,7). São compostas de uma região variável extracelular rica em cisteína N-terminal e de uma região C-terminal altamente conservada, incluindo um único domínio transmembranar e uma curta cauda citoplasmática 5-aminoácido (Figura 4)⁽⁶⁾. Estas proteínas formam uma camada espessa que representa a interface parasita-hospedeiro^(6,8).

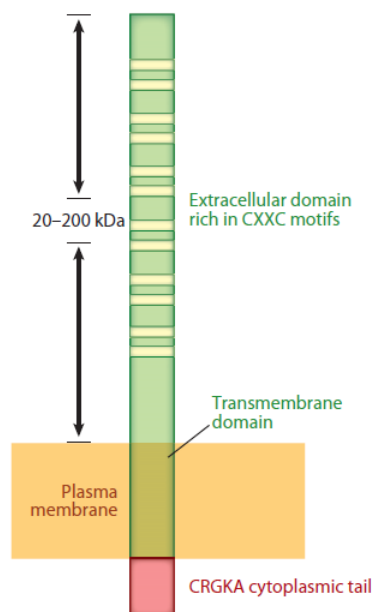


Figura 4. Representação esquemática da estrutura de uma VSP de *Giardia*⁽⁶⁾. A letra C representa a cisteína e a letra X um aminoácido.

O genoma de *Giardia* contém um repertório de aproximadamente 200 genes codificadores das VSPs, mas apenas uma VSP é expressa em um dado momento sobre a superfície do parasita^(2,6,9,10). A troca de uma VSP por outra, ocorre uma vez a cada 6 a 16 gerações, mesmo na ausência de pressão imunológica^(2,6). Os mecanismos de variação antigénica em *Giardia* são controlados por RNA interferente (RNAi) e a perturbação desta via gera trofozoítos que expressam simultaneamente numerosas VSPs^(1,2,6). Além disso, os gerbos sujeitos a infeção primária com *Giardia* expressando muitas VSPs foram protegidos contra infeções subsequentes, sugerindo que a variação antigénica é essencial para a evasão imune; esta informação pode ser útil para as estratégias de desenvolvimento de vacinas^(1,2,6,8,9).

As giardinas são proteínas pequenas, estruturais e constitutivas (29-38 kDa) que podem ser classificadas em quatro grupos: α -, β -, γ - e δ -giardinas⁽¹⁾. Estão associadas com microtúbulos no disco ventral e membrana plasmática dos trofozoítos^(1,10). Uma proteína imunorreativa de 32-kDa, identificada como sendo a α I-giardina, foi detetada em amostras de soro de pacientes infetados com *Giardia*. A caracterização desta proteína revelou que contém um epítipo altamente imunogénico entre os aminoácidos 160 e 200. Estudos adicionais demonstraram que a α I-giardina não só estimula a produção de anticorpos anti-*Giardia* (IgA e IgG2a), como também estabelece proteção contra infeções posteriores.

Várias proteínas metabólicas identificadas nos extratos de *Giardia* ativam respostas humorais em humanos e ratos infetados⁽¹⁾. As enzimas de *Giardia* ADI e OCT utilizam arginina para gerar ATP e são consideradas fatores de virulência de *Giardia*. O esgotamento de arginina modula os imunofenótipos e secreção de citocina das DCs durante a giardíase. A proteína FBA catalisa a clivagem da frutose-1,6-bifosfato. Esta enzima mostrou ser reconhecida por amostras de soro de humanos e de ratos com giardíase. A enolase é secretada por *Giardia* na presença de células epiteliais; esta hidrolase catalisa a eliminação irreversível da água do 2-fosfoglicerato para formar o fosfoenolpiruvato. Tem sido mostrado que a enolase se encontra localizada no citosol e na superfície da célula de vários organismos.

As HSPs são proteínas chaperonas expressas em células vivas, atuando na vigilância de células sob condições de stress, intrínsecas e extrínsecas⁽¹⁾. A HSP mais bem estudada é a HSP70 (70 kDa). Esta proteína tem sido relatada em outros organismos como sendo capaz de estimular o sistema imune inato. De facto, HSP70 foi proposta como candidata adjuvante para vacinas contra diversas doenças e também como candidata a vacinas contra outras infeções diferentes de *Giardia*. O conhecimento atual sobre HSP70 de *Giardia* é limitado; têm sido usadas como marcadores moleculares de organelos [retículo endoplasmático (ER), vesículas específicas de enquistamento (ESV)], fases do ciclo de vida (enquistamento) e diagnóstico de giardíase. GRP-78 ou proteína de ligação de imunoglobulinas (BIP), é uma proteína chaperona HSP-78 que foi identificada em *Giardia* como uma proteína resistente do ER, e foi também demonstrado como estando associada com ESV. Estudos anteriores em ratos BALB/c indicam que a BIP pode ser reconhecida pelo soro (IgG) de ratos infetados e imunizados com *Giardia*.

As CWP2s são expressas durante o processo de enquistamento e durante o tempo de vida do quisto e podem ser classificadas em dois grupos diferentes⁽¹⁾. As proteínas do grupo I são expressas durante as fases iniciais de enquistamento e estão localizadas nas ESV, enquanto as proteínas do grupo II estão localizadas exclusivamente na superfície da parede do quisto. Este grupo II de proteínas representa um antígeno candidato que pode potencialmente ser usado no desenvolvimento de uma vacina que impeça a transmissão de *Giardia*^(1,11). A proteína CWP2 é encontrada na parede celular de quistos. Estudos observaram que quando os ratinhos foram imunizados com CWP2, ocorreu a produção de anticorpos anti-*Giardia* IgA e IgG2a, e um efeito inibitório na libertação de quistos foi observado quando os ratinhos foram infetados com trofozoítos. Estudos posteriores

demonstraram que a administração de vacinas de ADN CWP2 por “bactofection” (transferência mediada por bactérias) conduz à eliminação de pelo menos 70% dos quistos^(1,11,12).

As respostas imunes celulares têm um papel importante no controlo da infeção por *Giardia*^(1,2). Os estudos sobre os antígenos específicos de *Giardia* que podem ser reconhecidos por células T para ativar eficazmente uma resposta imune têm sido limitados. Foram produzidos os primeiros hibridomas de células T específicos de *Giardia*, para avaliar a sua ativação por proteínas de *Giardia*⁽¹⁾. As proteínas de 90-110, 65-77 e 40-64 kDa estimularam vários hibridomas. Estes resultados sugerem que as células T participam ativamente no reconhecimento de antígenos de *Giardia*. No entanto, estudos adicionais são necessários para caracterizar essas proteínas imunorreativas. Curiosamente, BIP é capaz de induzir *in vitro* a maturação de DCs e a libertação de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-12 e IL-6). DCs estimuladas, induzem a ativação de células T naïve CD4⁺. Embora haja evidência de que a BIP tem potencial imunogénico, ainda é desconhecido se este antígeno pode induzir o desenvolvimento de um mecanismo imune eficaz contra *Giardia* num hospedeiro infetado. A identificação das proteínas imunorreativas que podem estimular eficazmente respostas das células T e B, serão importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas anti-*Giardia*.

4. TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLO DE *Giardia*

Dada a elevada prevalência da giardíase em crianças nos países em desenvolvimento e os efeitos da diarreia infantil e desnutrição, a giardíase tem um grande impacto na saúde pública⁽³⁾. Embora as consequências da giardíase sejam variáveis, programas de saúde escolar e educação em saúde para crianças e pais, destinados a reduzir a prevalência de infeções parasitárias intestinais em crianças, pode ter efeitos benéficos sobre o crescimento e desenvolvimento destas. Melhores métodos de diagnóstico, particularmente em pacientes assintomáticos, bem como estratégias de tratamento e de controlo mais eficazes, são extremamente necessários para ajudar a reduzir o impacto negativo da infeção sobre a população humana.

Estão disponíveis várias classes de fármacos antimicrobianos para o tratamento da giardíase^(9,13). Entre os mais utilizados estão os membros da família dos nitroimidazóis (NIs) como o metronidazol e tinidazol. No entanto, os fármacos disponíveis atualmente nem sempre são eficazes e ocorre resistência aos antiparasitários.

Para a prevenção e controlo da giardíase deve evitar-se água e comida contaminada, especialmente por viajantes e indivíduos que passam muito tempo ao ar livre⁽⁵⁾. A proteção é proporcionada pela fervura da água de beber de rios e lagos em países com uma elevada incidência endémica da doença. A manutenção adequada dos sistemas de filtração da água de abastecimento municipal é também necessária, uma vez que os quistos são resistentes aos procedimentos de cloração padrão. Devem ser feitos esforços a nível da saúde pública, para identificar os reservatórios de infeção e assim prevenir a propagação da doença, bem como evitar comportamentos sexuais de risco.

5. VACINAS CONTRA *G. lamblia*

Vacinação contra doenças infecciosas debilitantes e mortais estão entre as maiores conquistas da medicina moderna⁽¹⁰⁾. Vacinas bem-sucedidas são frequentemente formas atenuadas dos patogénios virulentos, porque imitam rigorosamente as interações com o sistema imune do hospedeiro, mas não causam manifestação da doença. Atenuação depende do isolamento de mutantes espontâneos do respetivo agente patogénico ou da capacidade para conceber mutações alvo por meio genéticos. Nenhuma destas estratégias tem sido aplicada ao parasita protozoário *Giardia* uma vez que mutantes de *Giardia* que colonizam o hospedeiro e interagem com o sistema imunológico mas não causam doença diarreica, não têm sido relatados. Em parte porque não há modelos animais adequados de diarreia associada a giardíase e a patofisiologia subjacente não é completamente compreendida. Uma vez que é pouco provável desenvolver uma vacina eficaz a partir de uma forma atenuada de *Giardia* é necessário recorrer a antígenos de *Giardia* em sistemas de vacinas vivas. O estudo atual mostra que esta estratégia pode ser bem-sucedida, uma vez que a expressão de um determinado antígeno conservado, $\alpha 1$ -giardina, em *Salmonella* recombinante atenuada conferiu proteção do hospedeiro contra a infeção subsequente de *Giardia*^(9,10). Uma melhor compreensão dos mecanismos imunes que contribuem para a proteção contra a reinfeção são necessários para ajudar a orientar o desenvolvimento de vacinas⁽¹²⁾.

Não está disponível uma vacina humana para giardíase^(8-10,12,13). Contudo, existe uma vacina veterinária (GiardiaVax[®]), composta de lisados de células totais obtidos a partir de uma mistura de isolados de ovelhas, cães e humanos, que reduz os sintomas e a duração da produção de quistos em gatos e cães. A vacina também tem sido utilizada como um agente imunoterápico em cães com giardíase crônica que não responderam ao tratamento, levantando a possibilidade intrigante de que uma vacina contra *Giardia* pode ser eficaz após a exposição⁽⁹⁾.

As respostas imunológicas a antígenos de quistos desenvolvem-se durante o decurso da infecção e várias vacinas vivas e de ADN CWP2, reduzem a eliminação de quistos e a transmissão de *Giardia*, sugerindo que é possível proteger toda a população animal em risco de infecção^(10,13). Estas vacinas de bloqueio de transmissão não reduzem o número de trofozoítos no intestino delgado, o que limita a sua potencial utilidade clínica como vacinas uma vez que apenas protegem contra quistos e não afetam os trofozoítos. Atendendo a que um número muito pequeno de quistos continua a ser eliminado e à elevada infecciosidade do parasita, a vacina não é 100% eficaz no bloqueio da transmissão.

A infecção de ratos por *Giardia* não induz aparentemente sintomas, tornando-os inadequados para o estabelecimento de relações dose/resposta para o número de parasitas e sintomas da doença⁽¹⁰⁾. Infelizmente, outros modelos animais, particularmente os gerbos, têm também limitações^(8,10). Assim, acabará por ser necessário realizar estudos em seres humanos para determinar a relação exata entre a carga infecciosa reduzida e os sintomas clínicos em indivíduos imunizados.

5.1. FASE ALVO

A pergunta óbvia que se coloca para a conceção de uma vacina contra *Giardia* é qual a fase alvo⁽¹⁴⁾. Desenhar uma vacina orientada contra a patologia é mais apropriada para as regiões onde a infecção é endémica e pode ser considerada mais como imunoterapêutica, uma vez que reduz a gravidade dos sintomas, levando a uma recuperação mais rápida do hospedeiro. Nos países desenvolvidos, educadores de infância, crianças de creches, crianças em idade escolar, viajantes internacionais, caminhantes, campistas, e nadadores que estão em risco iriam beneficiar deste tipo de vacina. Alternativamente, uma vacina bloqueadora de transmissão (TBV) é mais adequada em regiões em que a fonte de reservatório pode ser identificada. Na verdade, o objetivo de uma TBV de *Giardia* é reduzir a carga de quistos

infetantes libertados no ambiente, até ao ponto em que a transmissão não pode mais ser sustentada. Lançada em primeiro lugar no início dos anos 1980s, TBVs representaram uma nova abordagem para o controlo de organismos parasitários, uma vez que interferem diretamente com a transmissão e podem ser mais benéficas e rentáveis do que as vacinas profiláticas ou terapêuticas, realizando ambas as tarefas em simultâneo.

6. IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Embora haja vários motivos para justificar o desenvolvimento de uma vacina contra *Giardia*, existem três que podem ser considerados os mais importantes⁽¹⁴⁾. Em primeiro lugar, *Giardia* tem sido reconhecida como um agente patogénico oportunista reemergente afetando grupos de alto risco como crianças pequenas, os idosos e imunocomprometidos. Em segundo lugar, a giardíase é uma infeção debilitante grave que afeta milhares de pessoas anualmente, especialmente nos países em desenvolvimento devido à sua maior prevalência nessas áreas. Em terceiro lugar, *Giardia* tem um potencial zoonótico e o seu principal modo de transmissão é através da água de superfície não tratada, que é usada para beber, lavar os alimentos e higiene pessoal, especialmente nos países em desenvolvimento em que o acesso à água potável não é garantido.

7. ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

A chave para o desenvolvimento de vacinas contra *Giardia* é a identificação molecular de antígenos candidatos e avaliação da sua eficácia protetora⁽¹⁰⁾. Muitos dos estudos que têm sido feitos ao longo dos últimos anos, têm relatado antígenos de *Giardia* reconhecidos por anticorpos de doentes infetados ou de animais infetados experimentalmente^(10,13). Pelo menos vinte antígenos (14-125 kDa) foram caracterizados em extratos de trofozoítos ou quistos, mas apenas alguns deles foram identificados a nível molecular⁽¹⁰⁾. Entre os antígenos de *Giardia* melhor caracterizados estão os membros da família das VSPs, que constituem a maior fração de proteínas de superfície em trofozoítos.

Estudos mais recentes têm combinado a eletroforese bidimensional de alta resolução com a espectrometria de massa na identificação de pelo menos dezasseis proteínas imunorreativas, incluindo VSPs, α -giardinas, ADI, OCT e α -enolase, reconhecidas por soro ou leite materno de seres humanos com giardíase^(10,13). Onze dos doze antigénios identificados num modelo murino de giardíase, foram também reconhecidos por anticorpos de seres humanos previamente infetados⁽¹⁰⁾. Estes resultados sugerem que a especificidade antigénica das respostas imunes de murino e humanos para *G. lamblia* são notavelmente semelhantes e proporcionam validação importante para a utilização de modelos murinos, para compreender e prevenir a infeção de seres humanos.

Vacinas bem-sucedidas contra *Giardia* e outros patogénios entéricos importantes devem ativar as defesas das mucosas no trato intestinal⁽¹⁰⁾. Numerosos vetores vivos e abordagens baseadas em adjuvantes têm sido usadas para alcançar a vacinação eficaz por via das mucosas, com variados graus de sucesso. Vetores de vacina vivos dependem da síntese de antigénios e da libertação por micróbios atenuados. Uma vez que os micróbios são selecionados pela sua capacidade natural de interagir intimamente com a mucosa bem como com o sistema imune sistémico, eles induzem geralmente imunidade específica robusta e de longa duração. Sistemas de vacinas à base de *Salmonella* estão entre as tecnologias mais avançadas e promissoras para induzir proteção imunológica contra patogénios entéricos. A patogenicidade, fisiologia e genética dos sorotipos de *Salmonella* são conhecidos, podendo ser geneticamente manipulada com facilidade.

7.1. ESTUDOS COM VSPs

Uma característica particular de organismos parasitas é a sua capacidade de adaptação a alterações no ambiente⁽⁸⁾. Contudo, durante uma infeção, a sobrevivência de organismos patogénicos não depende apenas da sua aptidão para colonizar um hospedeiro, mas também da sua capacidade para neutralizar os mecanismos de defesa do hospedeiro. A variação antigénica de superfície é considerada um processo importante que permite a evasão do parasita do sistema imunitário, que conduz a infeção crónica apesar da resposta imune contínua^(8,9). A variação antigénica foi demonstrada em diversos microrganismos, incluindo *Giardia*, que utilizam vários mecanismos para alterar a expressão dos seus antigénios variáveis de superfície⁽⁸⁾.

Porque o mecanismo de proteção de *Giardia* pode depender da troca de expressão entre VSPs imunologicamente distintas, o hospedeiro deve ser capaz de prevenir a infecção desenvolvendo simultaneamente respostas imunitárias específicas para todas as moléculas de superfície variáveis⁽⁸⁾. Estudos mostraram que tanto a infecção primária com trofozoítos a expressar simultaneamente muitos VSPs ou imunização com VSPs purificados a partir de células transgênicas, protegem gerbos de infecções subsequentes com *Giardia*⁽⁸⁾. Estes resultados constituem uma evidência experimental de que a variação antigênica é essencial para a sobrevivência do parasita no interior de hospedeiros e que a perturbação artificial deste mecanismo pode ser útil na geração de vacinas contra importantes agentes patogênicos que mostrem um comportamento semelhante^(8,9). Além disso, a indução de uma resposta considerável contra *G. lamblia* com o repertório completo de VSPs foi associada a uma redução concomitante dos sinais de infecção, sugerindo que a vacinação provoca proteção contra a infecção.

As VSPs administradas por via oral são altamente imunogênicas, não induzem tolerância da mucosa e são resistentes à digestão proteolítica e pH baixo⁽⁸⁾. Estudos futuros, utilizando VSPs, que forneçam conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resistência à destruição do antígeno no intestino e sobre a tolerância da mucosa, podem ser relevantes nos esforços para desenvolver vacinas orais contra outros agentes patogênicos.

7.2. ESTUDOS COM *Streptococcus gordonii* EXPRESSANDO CWP2

Os quistos são estruturas de resistência protegendo o parasita das condições adversas do ambiente⁽¹¹⁾. São constituídos por uma parede rígida, contendo hidratos de carbonos e proteínas, numa proporção de 3:2 (w/w). Um componente proteico principal da estrutura da parede do quisto é a CWP2, que é reconhecida na mucosa intestinal de ratinhos infetados com *Giardia muris*.

Num estudo, utilizou-se *Streptococcus gordonii* para expressar um fragmento da CWP2 de 26 kDa, que contém um epítipo de células B, na superfície da célula bacteriana⁽¹¹⁾. Este foi o primeiro relato de *S. gordonii* expressando uma proteína de origem parasitária. Os anticorpos específicos IgA anti-CWP2 foram detetados em amostras fecais e anticorpos IgG anti-CWP2 foram detetados no soro, demonstrando a eficácia de *S. gordonii* na apresentação intragástrica de antígeno. Numa experiência piloto, os ratinhos imunizados mostraram uma redução significativa na produção de quistos de 70%.

7.3. ESTUDOS COM α 1-GIARDINA

O antígeno protetor, α 1-giardina, é um dos 21 membros da família das proteínas α -giardina em *G. lamblia*⁽¹⁰⁾. Estas proteínas foram inicialmente identificadas como proteínas estruturais do disco de fixação do parasita, mas foi descoberto mais tarde diferentes membros da família com localizações muito diversas. Pelo menos duas α -giardinas, α 1 e α 2, bem como δ -giardina, estão localizadas parcialmente na membrana plasmática do trofozoíto, tanto no lado citoplasmático como extracelular, podendo desempenhar funções na fixação do parasita ao epitélio intestinal. Os parasitas recém-enquistados têm níveis particularmente altos de α 1-giardina expostos à superfície. O bloqueio da α 1-giardina por anticorpos IgA secretores pode interferir com a ligação epitelial do parasita e, portanto, favorecer a remoção do lúmen intestinal. Os anticorpos contra δ -giardina inibem a ligação do parasita *in vitro*, embora não se saiba se este antígeno confere proteção *in vivo*. As funções da α 1-e de outras giardinas são atualmente mal conhecidas, o que torna difícil propor um mecanismo específico pelo qual respostas imunes contra elas possam contribuir para a eliminação do parasita.

Independentemente do mecanismo de proteção imunitária da α 1-giardina, o antígeno tem as características necessárias para um candidato a vacina⁽¹⁰⁾. É um dos antígenos conservados mais comum e reconhecido por humanos com giardíase. Os anticorpos contra α 1-giardina desenvolvem-se muito cedo durante as infecções humanas. A α 1-giardina exhibe elevada conservação de sequência e reatividade imunológica cruzada entre os diversos isolados de *Giardia*. Apenas uma única variação de aminoácidos foi observada na região imunogénica C-terminal (aminoácidos 160-200). Curiosamente, a mesma região mostra semelhança com o epítipo α 7.1-giardina, outra α -giardina antigénica e conservada, levantando a possibilidade de que a proteção conferida pela imunização com α 1-giardina pode ser parcialmente mediada pela reatividade cruzada com α 7.1-giardina.

7.4. ESTUDOS COM α -ENOLASE

Em contraste com a α 1-giardina, a imunização com uma vacina candidata α -enolase não protege contra a infeção⁽¹⁰⁾. Esta enzima catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato na via glicolítica e tem outras funções não-glicolíticas em muitos microorganismos. Localiza-se normalmente no citoplasma de trofozoítos de *G. lamblia*, tornando-a um alvo imunológico aparentemente improvável. No entanto, a α -enolase é

libertada por trofozoítos quando em contacto com células epiteliais do intestino, sem evidência de morte celular, o que presumivelmente a torna acessível ao reconhecimento imunológico do hospedeiro. Tal antigénio secretado, não associado fisicamente com os trofozoítos, pode atuar como um indicador de infeção para o hospedeiro e talvez como um desencadeante imunológico, melhorando a motilidade intestinal ou limitando a capacidade de *Giardia* para colonizar o hospedeiro, como tem sido descrito para outros agentes patogénicos.

7.5. ESTUDOS COM VETORES ATENUADOS DE *Salmonella*

Num estudo realizado, uma vacina viva atenuada de *Salmonella* expressando α I-giardina conferiu proteção e induziu a produção de anticorpos específicos de mucosa IgA e IgG2A sistémica, mas não de IgG1^(9,10). Um trabalho anterior usou um vetor atenuado de *Salmonella* expressando um antigénio VSP de *Giardia* e mostrou a indução de IgA na mucosa e IgG1 no soro, mas não de IgG2A, embora não tenha sido avaliada proteção contra a infeção^(10,15). Outro estudo utilizou um vetor atenuado de *Salmonella* que expressa o antigénio CWP2 de *Giardia*, e demonstrou a indução específica de IFN- γ , IL-4 e IgG2A específico no soro, mas não IgG1, o que foi associado com proteção contra a libertação de quistos⁽¹⁰⁾. Juntos, estes resultados sugerem que a indução de respostas imunes do tipo Th1 e IgG2A sistémica podem ser indicativos de proteção imunitária eficaz contra *Giardia*.

A vacina viva atenuada de *Salmonella* expressa o antigénio no citoplasma bacteriano⁽¹⁰⁾. Embora eficaz para a α I-giardina, estas características de localização e de expressão podem não ser ótimas para outros antigénios de *Giardia*. Por exemplo, a falta de uma resposta específica de anticorpos para OCT, cujos níveis de expressão total em *Salmonella* foram semelhantes *in vitro* às de α I-giardina e α -enolase, pode estar relacionada com a localização desfavorável do antigénio na bactéria, acesso imunitário *in vivo* insuficiente, ou níveis de expressão de antigénio insuficientes. Os antigénios podem ser tóxicos no vetor de vacina de *Salmonella*, como exemplificado pela ADI, para a qual não foi possível obter clones de expressão estáveis sob condições de produção máxima de antigénio. Modificações do antigénio ou estratégias de expressão diferentes podem permitir a produção fiável de antigénio e imunogenicidade. Além disso, o aumento observado na proteção com a coadministração da toxina da cólera ou a administração sublingual de antigénio, sugere que a capacidade protetora da α I-giardina e talvez de outros antigénios, pode ser aumentada por melhoramento do desenho do vetor e da administração de antigénio. Por fim, deve salientar-

se que, independentemente das vacinas atenuadas de *Salmonella* serem ou não ideais para a vacinação contra a giardíase, o conhecimento obtido sobre os antígenos protetores irá ser no entanto muito valioso e aplicável a outras estratégias de vacinação.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os esforços futuros e progressos no controlo da giardíase são esperados em três aspetos: clarificação dos mecanismos de resistência a fármacos, desenvolvimento de vacinas eficazes, e identificação de mais alvos para novos fármacos e vacinas⁽¹³⁾.

Uma vez que a resistência aos fármacos existentes tem emergido muito rapidamente e as vacinas são tão limitadas (inexistentes para os seres humanos) é urgente identificar potenciais alvos para desenvolver novos fármacos e vacinas⁽¹³⁾. O conhecimento da patogénese da giardíase e da biologia celular e molecular básica, tais como processos de enquistamento e desenquistamento e a interação com enterócitos do hospedeiro, irão certamente ajudar a encontrar novos alvos. A comparação das vias metabólicas de *Giardia* com os homólogos dos seus hospedeiros é também muito importante para identificar características específicas de *Giardia* como potenciais alvos de fármacos. Mais importante, ainda, é o sequenciamento genómico total de mais isolados de *Giardia* de forma a identificar potenciais alvos.

9. CONCLUSÃO

Embora as vacinas comerciais, por exemplo GiardiaVax[®], estejam disponíveis para cães e gatos, ainda não foram desenvolvidas com sucesso vacinas para seres humanos⁽¹³⁾. A vacina disponível para animais, proteína recombinante rCWP2, parece reduzir apenas a eliminação dos quistos mas não o número de trofozoítos.

A vacinação com as várias VSPs, demonstra o papel das variantes antigênicas a evadir o sistema imunitário do hospedeiro e confirma o papel essencial da variação antigênica como um mecanismo de adaptação desenvolvido por parasitas para causar infecções crônicas e recorrentes⁽⁸⁾. Uma vez que muitos agentes patogênicos estão sujeitos a variação antigênica, estirpes não virulentas de parasitas em que o mecanismo de variação antigênica pode ser desregulado para permitir a expressão de múltiplas variantes, pode constituir uma ferramenta útil para o desenvolvimento de vacinas. A demonstração desta prova de princípio em *Giardia* pode implicar alterações nas estratégias atuais sobre imunoprevenção para parasitas que têm variação antigênica.

A vacina viva atenuada de *Salmonella* expressando α 1-giardina confere proteção significativa contra infecção subsequente com *Giardia*⁽⁹⁾. Além disso, a α 1-giardina possui elevada conservação na sequência de aminoácidos e reatividade imunológica cruzada contra vários isolados de *Giardia*. Estes resultados suportam o desenvolvimento contínuo da α 1-giardina como um antígeno candidato a vacina contra a giardíase.

A identificação de novos alvos antimicrobianos para a concepção de fármacos e vacinas contra *Giardia* permanece nos estádios preliminares e são necessários mais estudos⁽⁹⁾.

Dada a importância de uma vacina contra uma das doenças parasitárias mais comuns do trato intestinal, o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação continua a ser um objetivo importante de investigação na giardíase^(9,13).

10. REFERÊNCIAS

1. Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velazquez C. **Host defences against *Giardia lamblia***. Parasite Immunol [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 Jan 16];37(8):394–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26072999>.
2. Heyworth MF. **Immunological aspects of *Giardia* infections**. Parasite [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jan 16];21:55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4209855&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
3. Halliez MCM, Buret AG. **Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections**. World J Gastroenterol [Internet]. 2013 Dec 21 [cited 2016 Jan 16];19(47):8974–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
4. Cotton J a, Amat CB, Buret AG. **Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract**. Pathog (Basel, Switzerland) [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Dec 1];4(4):764–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26569316>.
5. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. Medical Microbiology, chapter 73 **Intestinal and Urogenital Protozoa** (pag715-727). Elsevier. 2016 [cited 2016 Jan 16].
6. Prucca CG, Rivero FD, Luján HD. **Regulation of antigenic variation in *Giardia lamblia***. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Jan 16];65:611–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740226>.
7. Bartelt L a, Sartor RB. **Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae**. F1000Prime Rep [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Sep 2];7(May):62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4447054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

8. Rivero FD, Saura A, Prucca CG, Carranza PG, Torri A, Lujan HD. **Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine.** Nat Med [Internet]. 2010 May [cited 2016 Jan 16];16(5):551–7, 1p following 557. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418884>.
9. Watkins RR, Eckmann L. **Treatment of giardiasis: current status and future directions.** Curr Infect Dis Rep [Internet]. 2014 Feb [cited 2015 Dec 15];16(2):396. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24493628>.
10. Jenikova G, Hruz P, Andersson MK, Tejman-Yarden N, Ferreira PCD, Andersen YS, et al. **α 1-giardin based live heterologous vaccine protects against *Giardia lamblia* infection in a murine model.** Vaccine [Internet]. 2011 Nov 28 [cited 2016 Jan 16];29(51):9529–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
11. Lee P, Faubert GM. **Oral immunization of BALB/c mice by intragastric delivery of *Streptococcus gordonii*-expressing *Giardia* cyst wall protein 2 decreases cyst shedding in challenged mice.** FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Jan 16];265(2):225–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081198>.
12. Li E, Liu M, Singer SM. **Resistance to reinfection in mice as a vaccine model for giardiasis.** Hum Vaccin Immunother [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jan 16];10(6):1536–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24805818>.
13. Tian H-F, Chen B, Wen J-F. **Giardiasis, Drug Resistance, and New Target Discovery.** Infect Disord - Drug Targets [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2016 Jan 16];10(4):295–302. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5265&volume=10&issue=4&spage=295>.
14. Hugo D, Lujan, Staffan Svärd. *Giardia: A Model Organism*, chapter 21 (pag 333-334) **Vaccination Against *Giardia*.** Springer Science & Business Media, 2011 [cited 2016 Jan 16]. Available from: <http://www.springer.com/us/book/9783709101971>.

15. Gabriela Jenikova^a, Petr Hruza, Karl M. Andersson^a, Noa Tejman-Yardena, Patricia C. D. Ferreira^a, Yolanda S. Andersen^a, Barbara J. Davids^a, Frances D. Gillina, Staffan G. Svärd^b, Roy Curtiss III^c, and Lars Eckmann^a. **α 1-giardin based live heterologous vaccine protects against *Giardia lamblia* infection in a murine model.** NIH Public Access, 2011 [cited 2016 Jan 16];126(3):292–7 . Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001876>.