

Ana Esperança de Pina Pires

Desenvolvimento de fármacos contra *Giardia duodenalis* Potenciais alvos terapêuticos em protozoários flagelados

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

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Esperança de Pina Pires

**Desenvolvimento de fármacos contra *Giardia duodenalis*
Potenciais alvos terapêuticos em protozoários flagelados**

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

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Esperança de Pina Pires, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011157705, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade 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 Julho de 2016

(Ana Esperança de Pina Pires)

Agradecimentos

Começo por agradecer à Professora Doutora Maria do Céu R. Sousa pelo apoio prestado durante a realização desta monografia.

Agradeço aos meus pais pelos sacrifícios passados até que eu chegasse aqui, pelo apoio, pelas palavras reconfortantes e pela força, sem eles nada teria sido possível.

Ao Vasco agradeço a paciência e o companheirismo, agradeço a interajuda e o apoio nos momentos mais difíceis.

À Dina, um muito obrigado por aquela força especial e pela calma.

À Ana quero agradecer a amizade de longa data, o apoio e animo transmitido sempre, mas principalmente nas alturas mais desesperantes.

Ao resto dos meus amigos, um muito obrigado pela companhia ao longo desta etapa da minha vida, nos bons e nos maus momentos.

À minha família em geral, obrigado pelo apoio, pela ajuda, pela força e pelas viagens a Coimbra.

Agradeço a todos os que de qualquer forma contribuíram para a minha chegada a Farmacêutica.

Por fim agradeço à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelos conhecimentos que me permitiu adquirir e pelos excelentes profissionais que contribuíram para o meu crescimento enquanto estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Índice

Abreviaturas.....	3
Resumo	4
Palavras-chave.....	4
Abstract	5
Keywords.....	5
1- Introdução	6
2- <i>Giardia</i> e giardíase	7
2.1- Descrição do parasita.....	7
2.2- Algumas considerações sobre a giardíase.....	10
2.3- Prevenção.....	13
3- Tratamento farmacológico da giardíase - alvos, fármacos e resistências.....	14
3.1- Compostos 5-nitroimidazóis – metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol	15
3.2- Composto 5-nitrotiazol - nitazoxanida	16
3.3- Benzimidazóis – albendazol e mebendazol	16
3.4- Nitrofuranos – furazolidona	17
3.5- Quinacrina (mepacrina).....	18
3.6- Aminoglicosídeos – paromomicina.....	18
3.7- Polipeptídeo – bacitracina-zinco	18
4- Fármacos aprovados para outras situações que estão em estudo quanto à atividade antigiardial.....	19
4.1- Auronofina	19
4.2- Fumaligina.....	20
4.3- Cloroquina	20
4.4- Orlistato	21
4.5- Miltefosine.....	21
4.6- Omeprazol	21
4.7- Outros	22
5- Perspetivas futuras para o tratamento da giardíase - pesquisa de novos fármacos e possíveis alvos.....	22
5.1- 2-aryl-3-hydroxymethylimidazo [1,2-a] pyridine and pyrimidine.....	22
5.2- Composto anti tumoral NBDHEX (6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-tieniltio)hexanol)	23
5.3- Análogos das purinas	23
5.4- Moléculas com capacidade de induzir stress nitrosativo.....	24

5.5- Extratos de <i>Terminalia ferdinandiana</i> , <i>Corniculata oxalis</i> , <i>Osvris alba</i> e óleos essenciais..	24
5.6- Galotaninos, compostos com uma unidade lactona ou com ácido quínico	25
5.7- Outros	26
5.8- Alvos terapêuticos	26
5.9- Interação com o hospedeiro	27
Conclusão.....	28
Referências bibliográficas	30

Abreviaturas

VSP's – *Variant Specific Surface* (proteínas específicas de superfície)

CWP's – *Cyst Wall Protein* (proteínas da parede do quisto)

MUC 2 – *Mucin 2* (proteína mucina)

MetAPI – *Methionyl Aminopeptidase 1* (aminopeptidase-1-metionina)

MetAP2 – *Methionyl Aminopeptidase 2* (aminopeptidase-2-metionina)

IgA – Imunoglobulina do tipo A

NO – *Nitric Oxide* (Óxido nítrico)

NOS – *Nitric Oxide Synthases* (Óxido nítrico sintetase)

NR – Nitro-redutase

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

mRNA – *messenger RNA* (RNA mensageiro)

tRNA – *transfer RNA* (RNA de transferência)

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

ATP – *Adenosine Triphosphate* (adenosina trifosfato)

NADH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de nicotinamida e adenina)

NADPH – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina)

ADP – *Adenosine Diphosphate* (adenosina difosfato)

FAD – *Flavin Adenine Dinucleotide* (dinucleótido de flavina e adenina)

Resumo

Giardia é um protozoário entérico flagelado que engloba seis espécies. *Giardia duodenalis* é a espécie mais preocupante para o homem, mais concretamente os grupos genéticos assemblages A e B. Morfologicamente apresenta duas formas, o quisto (forma infetante e altamente resistente) e o trofozoíto (forma vegetativa). A via de transmissão é fecal-oral e 10 a 25 quistos são suficientes para causar a doença. A virulência do parasita em muito contribui para o aparecimento da doença, apresentando o parasita como fatores de virulência os flagelos e as proteínas específicas de superfície.

Em 60 a 80% dos casos a giardíase é assintomática, mas podem surgir sintomas como dores abdominais, flatulência, náuseas, vômitos e anorexia. Quando a doença se prolonga no tempo podem advir outras complicações, podendo observar-se diarreia crónica (4% dos casos), mais comum em áreas endémicas e indivíduos imunocomprometidos.

Na maioria dos casos a giardíase é autolimitada, não necessitando qualquer tipo de tratamento. Quando há necessidade de terapêutica farmacológica recorre-se em primeira linha ao metronidazol e albendazol, um 5-nitroimidazol e um benzimidazol, respetivamente. Porém é cada vez mais comum o aparecimento de resistências, pelo que se recorre a outros fármacos como a furazolidona, nitazoxanida, quinacrina, paramomicina e bacitracina-zinco.

Nenhum fármaco tem, atualmente, o perfil de eficácia e segurança ideal devido aos efeitos secundários, resistência aos fármacos e ao abandono da terapêutica pelos regimes posológicos complexos. Observa-se, assim, a uma pesquisa constante de novas moléculas com atividade anti-giardial, das quais se salienta o composto anti-tumoral NBDHEX e os análogos das purinas. Por um lado, testam-se moléculas já aprovadas para outros fins terapêuticos, como por exemplo a auronofina, fumaligina, cloroquina, orlistato, miltefosine e omeprazol. Por outro lado, o estudo da biologia e da bioquímica do parasita permite a identificação de alvos essenciais para a sua sobrevivência, como é o caso de dihidrolase, o carbamato quinase e enzimas superóxido redutase e NADPH oxidase, essenciais para a obtenção de energia. Observa-se também o renascer da fitoterapia, principalmente com o objetivo de diminuir os efeitos secundários.

Palavras-chave

Giardia duodenalis, giardíase, prevenção, tratamento, eficácia/efetividade, alvos farmacológicos

Abstract

Giardia is a flagellated enteric protozoan which comprises six species. *Giardia duodenalis* is the most disturbing species for humans, specifically genetic groups assemblages A and B. Morphologically has the cyst-form (infective, highly resistant) and trophozoite (vegetative form). The transmission is fecal-oral and 10 to 25 cysts are sufficient to cause disease. The parasite virulence in greatly contributes to the emergence of the disease, with the parasite virulence factors as the flagella and the specific surface proteins.

Most of giardiasis cases is asymptomatic (60 to 80%), but may also appear symptoms such as abdominal pain, flatulence, nausea, vomiting and anorexia. When the disease is prolonged in time may result another complication, chronic diarrhea could be observed (4% of cases), more common in endemic areas and immunocompromised.

In many cases, giardiasis is self-limiting and does not require any treatment. When there is a need for drug therapy relies on metronidazole (5-nitroimidazole) and albendazole (benzimidazole) as first line. However, the emergence of resistance it is increasingly common, so other agents such as furazolidone, nitazoxanide, quinacrine, paromomycin and bacitracin zinc are used.

No drug currently has the efficacy profile and optimal safety due to side effects, drug resistance and the complex dosing regimens that that lead to abandonment of therapy. Thus it is observed a constant research for new molecules with anti-giardial activity, stands out the anti-tumor compound NBDHEX and the analogs of purines. For one hand, molecules already approved for other therapeutic purposes are tested against *Giardia duodenalis*, for example the auranofin, fumagillin, chloroquine, orlistat, miltefosine and omeprazole. Moreover, the study of the biology and biochemistry of the parasite allows the identification of targets essential for survival, such as the case of dihidrolase, the carbamato kinase, superoxide reductase and NADH oxidase enzymes essential for obtaining energy. It is also observed the revival of herbal medicine, mainly in order to reduce side effects.

Keywords

Giardia duodenalis, giardiasis, prevention, treatment, efficiency/ effectiveness, pharmacological targets

I - Introdução

Giardia duodenalis, também conhecida como *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis* é um parasita flagelado. Pertence ao género *Giardia*, família Hexamitidae, ordem Diplomonadida, sub-filo Mastigophora (flagelados) e filo Sarcomastigophora. É o patógeno protozoário mais comumente encontrado a nível mundial e o único que coloniza o lúmen do intestino delgado (duodeno e jejuno) (Paniker, 2013). Infeta mil milhões de pessoas, sendo que surgem 200 a 300 milhões de novos casos por ano. Este parasita pode considerar-se a maior fonte de doenças transmitidas pela água em todo o mundo (Ansell *et al.*, 2015). Os surtos de giardíase observam-se principalmente em creches ou lares, nos viajantes que visitam países com condições de higiene precárias, em caminhantes ou numa dada população abastecida por dado curso de água que, por qualquer razão, tenha sido contaminado. Estima-se que em Portugal a taxa de infeção seja de 3,7%, mas este valor pode ser inferior ao real, devido à subnotificação (principalmente porque há casos agudos que se resolvem espontaneamente sem a necessidade de diagnóstico) (Yaoyu e Xiao, 2011). A giardíase incide mais em regiões de clima temperado (Rey, 2002).

A infeção por *G. duodenalis* pode ser aguda ou evoluir para a forma crónica. Geralmente a doença aguda resolve-se espontaneamente e é, muitas vezes, assintomática. Já a forma crónica necessita tratamento e é quase sempre sintomática, variando os sintomas desde diarreia, dores abdominais, náuseas a síndrome de má absorção, défice de crescimento e atraso na aprendizagem (Ansell *et al.*, 2015).

As doenças diarreicas (como a giardíase) são debilitantes, sendo mesmo a segunda causa de morte em crianças até aos 4 anos (Ansell *et al.*, 2015). Tendo em conta a falta de medicamentos eficazes e seguros na erradicação deste parasita, este trabalho pretende fazer não só um levantamento e uma análise da terapêutica existente, como também dos possíveis alvos terapêuticos.

2- *Giardia* e giardíase

2.1- Descrição do parasita

Giardia é um gênero de protozoário entérico flagelado que engloba seis espécies, sendo a *Giardia duodenalis*, também conhecida por *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia* ou *Lamblia intestinalis* responsável pela giardíase humana (Yaoyu e Xiao, 2011; The Center for Food Security & Public Health, 2012). A espécie *G. duodenalis* divide-se ainda em sete assemblages (de A a G), sendo que as assemblages A e B apresentam baixa especificidade de hospedeiro, ao contrário dos restantes cinco, que demonstram elevada especificidade quanto à espécie hospedeira (The Center for Food Security & Public Health, 2012). As assemblages mais comumente encontradas em isolados humanos são a A e a B (Nash, 2013), podendo estas ser ainda subdivididas em subassemblages (The Center for Food Security & Public Health, 2012). Há estudos que indicam que a virulência da assemblage A é superior à assemblage B, outros estudos apontam o contrário (The Center for Food Security & Public Health, 2012). Para além das diferenças na patogenicidade (Cotton, Amat e Buret, 2015), as assemblages A e B são geneticamente bastante diferentes, ao ponto de se ponderar serem espécies diferentes. A sua classificação em duas espécies não se verifica pois não cumprem alguns conceitos para a distinção de espécies, como infetarem hospedeiros diferentes (Jerlström-Hultqvist, Ankarklev e Svärd, 2010).

Giardia duodenalis é um parasita flagelado, eucariota e unicelular. Morfologicamente apresenta duas formas distintas, o trofozoíto (forma vegetativa) e o quisto (forma infetante) (Fig. 1). O trofozoíto apresenta uma forma piriforme, sendo arredondado na região anterior e afilado na região caudal. Mede 10 a 20µm de comprimento por 5 a 15µm de largura e 4µm de espessura. Possui um achatamento dorsoventral e contém uma área achatada e circular que se denomina disco adesivo ou suctorial e que participa na adesão do trofozoíto à mucosa da porção inicial do intestino delgado. Apresenta simetria bilateral, um par de núcleos, quatro pares de flagelos (um par anterior, dois pares ventrais e um par caudal) que conferem a mobilidade ao trofozoíto. Possui dois corpos parabasais, em forma de vírgula, que correspondem ao aparelho de Golgi. Ao longo do eixo longitudinal celular contém o axostilo (constituído por dois axonemas) de onde saem os flagelos (Rey, 2002; Paniker, 2013; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013). O parasita não apresenta mitocôndrias, é microaerofílico e tem mitossomas, organelos muito reduzidos que participam na biossíntese do cluster ferro-enxofre. A energia necessária é produzida por fosforilação de substrato ou fermentação, que ocorre no interior da membrana plasmática (Lalle et al., 2015).

Já o quisto é pequeno e oval (elipsoide ou ovoide), medindo 12µm por 8µm (Fig.1). Possui uma parede quística hialina bem destacada do citoplasma e dois pares de núcleos. O axóstilo (constituído por quatro axonemas) também se consegue observar, assim como os corpos parabasais, que também são quatro (Paniker, 2013).

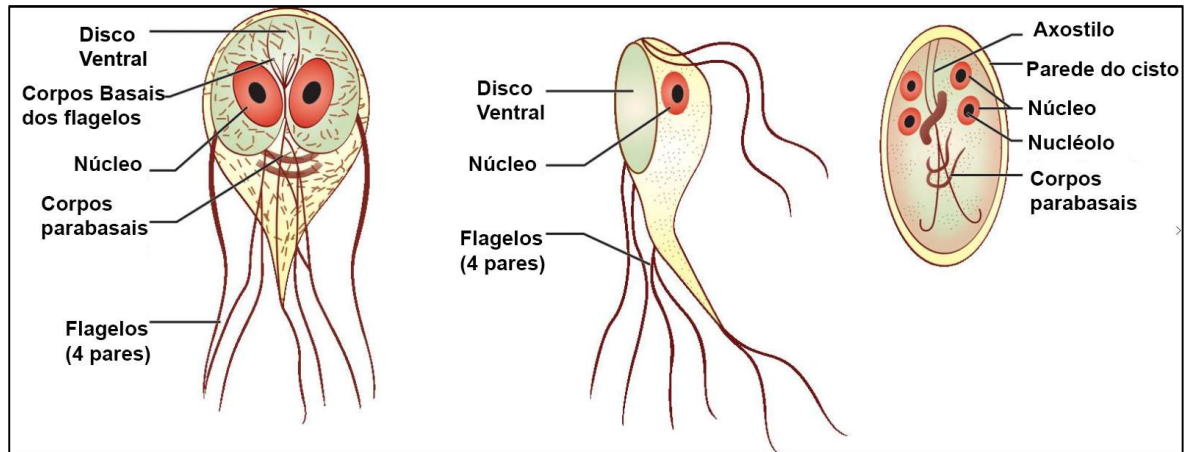
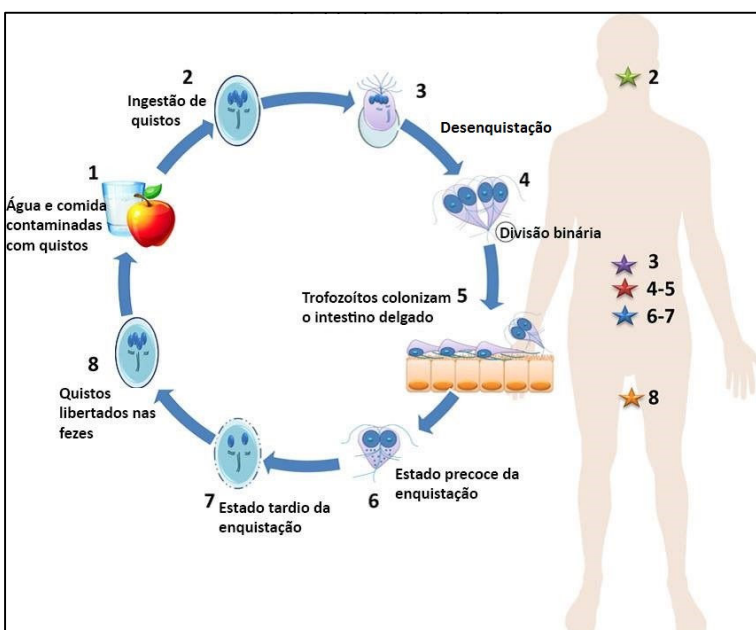


Figura 1: Estrutura de *Giardia duodenalis* (trofozoítio e quisto). Adaptada de Paniker, 2013.

Giardia apresenta um ciclo de vida pouco complexo, transitando entre o quisto e o trofozoítio (Fig.2). O quisto é a forma infetante, que pode ser ingerido na água, em alimentos contaminados, por contacto direto com pessoas infetadas ou fômites, havendo portanto uma transmissão fecal-oral (Nabarro et al., 2015). Depois da ingestão do quisto, o pH ácido do estômago estimula o desenquistamento, dando origem a quatro trofozoítos. Estes aderem à mucosa e às microvilosidades da barreira epitelial intestinal na porção inicial do intestino delgado, onde é mais fácil obter nutrientes e não há tanta competição com a flora bacteriana (Mastronicola et al., 2015). Por vezes podem invadir as vias biliares de forma a obter fosfolípidos, causando cólica biliar e icterícia. O trofozoítio alimenta-se através da membrana e por processos de pinocitose (Paniker, 2013).



fosfolípidos, causando cólica biliar e icterícia. O trofozoítio alimenta-se através da membrana e por processos de pinocitose (Paniker, 2013).

Figura 2: Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*. Pode observar-se a ingestão dos quistos através de água ou alimentos contaminados, os processos que ocorrem durante a sua estadia no hospedeiro humano e a sua excreção via fecal. Adaptada de Lopez-Romero et al., 2015.

Reproduzem-se assexuadamente, por divisão binária longitudinal, colonizando o lúmen e a superfície intestinal, mas não invade camadas mais profundas da mucosa. Apesar da reprodução ser unicamente assexuada verifica-se a existência de recombinação genética, muito útil para a adaptação do parasita a condições adversas (Yaoyu e Xiao, 2011). Os trofozoítos vão depois descendo pelo intestino até ao cólon, onde, estimulados pelos sais biliares e pH alcalino, produzem os componentes da parede do quisto (entre os quais as três proteínas fundamentais – CWP) e as vesículas secretoras, que transportam proteínas da parede cística (Gottig *et al.*, 2006).

Os trofozoítos têm dois núcleos, cada um com genoma diploide (2N), sendo, portanto, o genoma tetraploide (4N). Durante o enquistamento o genoma torna-se 16N, pois há dois ciclos de replicação cromossómica sem divisão celular (Bernander, Palm e Svärd, 2001; Lopez-Romero *et al.*, 2015). Um quisto tem então quatro núcleos, cada um com genoma tetraploide. Durante a desenquistação obtém-se quatro trofozoítos, cada um com dois núcleos diploides. (Bernander, Palm e Svärd, 2001; Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Os quistos expelidos são bastante resistentes, sobrevivendo em condições adversas. Quanto à sua infecciosidade, há alguns estudos que apontam para a necessidade de maturação durante aproximadamente sete dias, ao passo que outros mostraram que são infecciosos aquando da sua saída do hospedeiro (The Center for Food Security & Public Health, 2012).

G. duodenalis é um parasita altamente contagioso, pois para além da resistência que os quistos apresentam a condições adversas e aos desinfetantes mais comuns, 10 a 25 quistos são suficientes para causar doença (Nash *et al.*, 1987). Após a sua ingestão, o período de incubação varia de 1 a 45 dias e os sintomas surgem no espaço de 1 a 2 semanas (The Center for Food Security & Public Health, 2012; Murray, Rosenthal e Pfaller, 2013). Durante a infeção poderão ser eliminados 200000 quistos por grama de fezes (Paniker, 2013).

Estudos recentes indicam que os flagelos podem contribuir para a virulência de *Giardia*, pois para além de conferirem mobilidade, podem contribuir para a adesão à mucosa e podem ainda provocar danos na mesma, permitindo uma maior e mais fácil colonização (Krüger e Engstler, 2015). Movimentos hídricos provocados pelos flagelos podem ainda facilitar a alimentação dos trofozoítos (Krüger e Engstler, 2015). As proteínas específicas de superfície (VSP's) são também um fator de virulência bem conhecido. O parasita altera as suas VSP's para escapar ao sistema imune do hospedeiro e assim conseguir sobreviver (Paniker, 2013).

Como fonte primária de energia o trofozoíto usa L-arginina, utilizada também pelo hospedeiro na constituição de proteínas e em vias de sinalização. A depleção de L-arginina pode levar ao aparecimento de giardíase sintomática, para além das consequências orgânicas,

como diminuição da produção de óxido nítrico (importante na erradicação do parasita), modulação de células T, alteração da função de células dendríticas e inibição da proliferação epitelial intestinal. Assim, a suplementação com ornitina (percursor da L-arginina) aquando da reidratação poderá ser benéfica na giardíase (Cotton, Amat e Buret, 2015).

2.2- Algumas considerações sobre a giardíase

Giardíase (ou giardiose) é uma doença gastrointestinal provocada por parasitas do género *Giardia*, quando os trofozoítos colonizam o intestino delgado do hospedeiro. A principal espécie, se não a única, causadora de giardíase no homem é *Giardia duodenalis* (The Center for Food Security & Public Health, 2012). A infeção pode ser assintomática (60 a 80% dos casos) ou pode estar associada a sintomas (20 a 40% dos casos) como diarreia aguda com cheiro fétido e aspeto gorduroso (contém frequentemente muco, mas raramente sangue ou pus) (Gardner e Hill, 2001; The Center for Food Security & Public Health, 2012). Dores abdominais, flatulência, náuseas, vómitos e anorexia são também sintomas comuns. Em casos mais graves observa-se perda de peso, desidratação, fadiga, anemia, podendo culminar em síndrome de má absorção (que inclui deficiência em dissacaridasas e em vitaminas), atraso no crescimento e capacidade cognitiva é também passível de ocorrer em crianças (Buret, 2008; The Center for Food Security & Public Health, 2012). A diarreia crónica, característica de infeção crónica (4% dos casos) não é comum, com exceção de áreas endémicas ou de indivíduos imunocomprometidos (apesar de não ser um parasita oportunista). Aquando de infeção crónica é ainda possível desenvolverem-se complicações extraintestinais, tais como patologias articulares, dérmicas, oculares e até mesmo alterações no sistema nervoso central, sendo que os mecanismos envolvidos são desconhecidos (The Center for Food Security & Public Health, 2012; Cotton, Amat e Buret, 2015). A giardíase raramente é fatal e em cerca de 85% dos casos é autolimitada (Miyamoto e Eckmann, 2015).

Para explicar a variabilidade sintomática muitas hipóteses têm sido consideradas, desde o genótipo da estirpe, quantidade de quistos ingeridos, coinfeções e fatores do hospedeiro, como estado nutricional e imunidade, nomeadamente a capacidade de produzir IgA (Astiazarán-García *et al.*, 2015).

É de notar que há maior propensão para giardíase sintomática em países desenvolvidos. Contrariamente, nos países em desenvolvimento há uma maior taxa de giardíase assintomática (Faubert, 2000), o que torna difícil o diagnóstico e tratamento, com conseqüente propagação da infeção. Verifica-se, também, que a severidade dos sintomas é maior em países desenvolvidos (Cotton, Amat e Buret, 2015).

A interação trofozoíto-hospedeiro desencadeia respostas fisiopatológicas responsáveis pela doença diarreica. Tal como nalgumas doenças inflamatórias crônicas (ex. doença de Crohn), na infecção por *G. duodenalis* verifica-se disfunção da barreira intestinal (muco e/ou epitélio intestinal), havendo um aumento da permeabilidade ou até mesmo a sua perfuração. Esta disfunção da barreira epitelial pode dever-se à degradação da proteína MUC2 (principal proteína constituinte do muco) ou ao seu esgotamento (Cotton, Amat e Buret, 2015). O disco ventral, responsável pela aderência do trofozoíto à mucosa intestinal, também poderá alterar a barreira (Gardner e Hill, 2001). Verifica-se, também, o encurtamento das microvilosidades intestinais, assim como a sua atrofia. Há a ativação de linfócitos do hospedeiro e hipersecreção aniônica, com consequente aumento do trânsito intestinal (Astiazarán-García *et al.*, 2015). *G. duodenalis* poderá também libertar substâncias citopáticas que desencadeiam a libertação de citocinas e inflamação (Gardner e Hill, 2001).

A imunidade inata e adaptativa agem em conjunto para controlar a infecção por *Giardia duodenalis* (Fig.3) (Lopez-Romero *et al.*, 2015). A primeira barreira à fixação do parasita é a barreira mecânica – muco e peristaltismo. O muco diminui a adesão e o peristaltismo aumenta o trânsito intestinal, com consequente aumento da eliminação parasitária. Os peptídeos antimicrobianos vão também participar na erradicação de *G. duodenalis*. O microbiota intestinal compete com o parasita e modula a resposta imune. A resposta imune inata inclui os mastócitos, que libertam IL-6 e em conjunto com o óxido nítrico aumentam o peristaltismo intestinal, com consequente aumento da eliminação parasitária. O óxido nítrico inibe ainda o desenquistamento e a enquistação. Inclui também as células M, que por sua vez reconhecem antígenos e induzem a resposta imunológica. As células dendríticas fazem a ligação entre imunidade inata e adaptativa, reconhecem os antígenos e apresentam-nos às células T, que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e IgA, que neutralizam o parasita (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

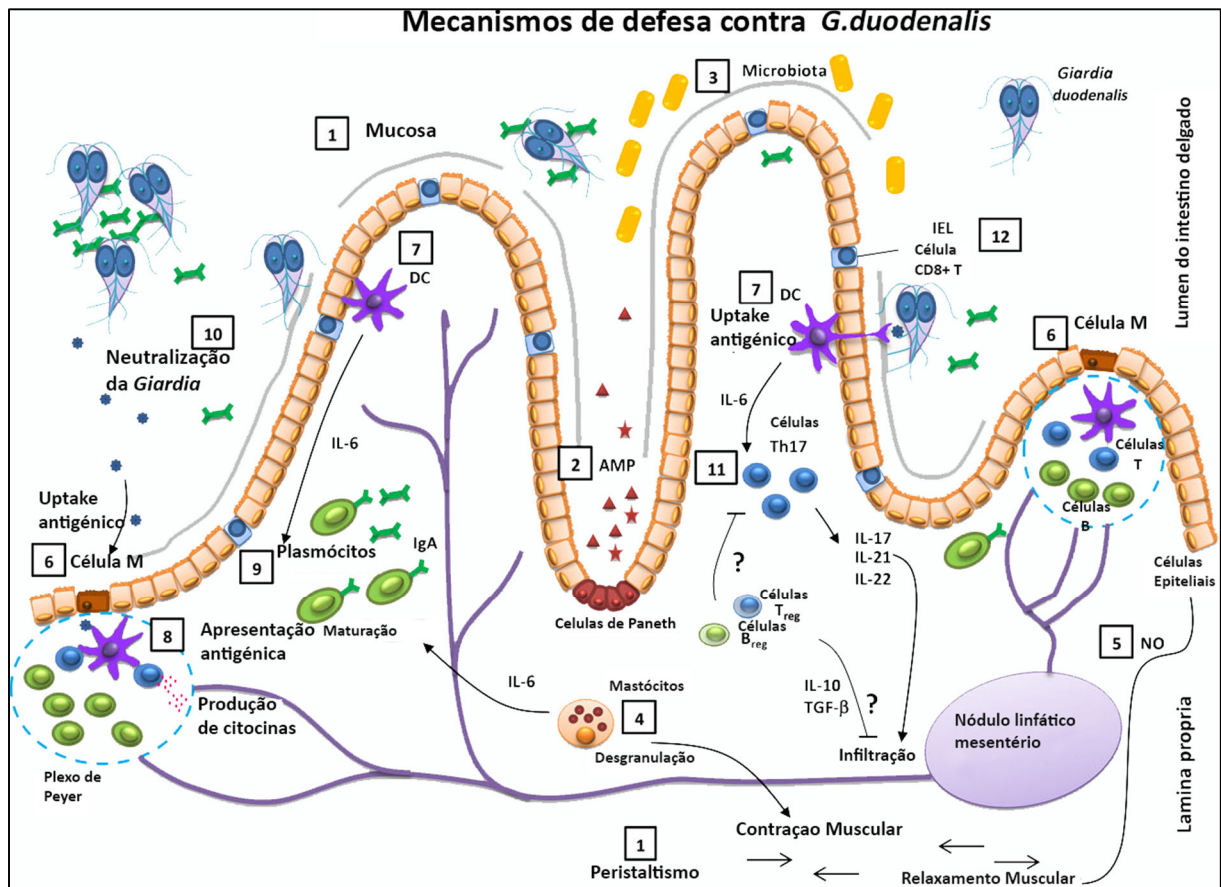


Figura 3: Imagem explicativa dos mecanismos de imunidade contra o parasita quando da sua chegada ao lúmen intestinal humano.

- 1- Camada de muco e peristaltismo são as barreiras mecânicas que impedem a fixação.
- 2- Peptídeos antimicrobianos.
- 3- Microbiota intestinal, efeito anti-giardial pela competição, toxicidade ou modulação da resposta imune.
- 4- Mastócitos que libertam IL-6 (citocina pró-inflamatória) e promovem o peristaltismo.
- 5- Óxido nítrico, produzido a partir da L-arginina pela NO sintetase tem um efeito citopático, inibe a exquistação/enquistação e aumenta o peristaltismo.
- 6- Células M, captam antígenos por endocitose e induzem respostas imunes.
- 7- Células dendríticas (DC), que ligam a resposta imune inata à adaptativa. Reconhecem antígenos e apresentam-nos às células T.
- 8- Produção de citocinas.
- 9- IL-6, vinda das DC, das células T ou dos mastócitos induzem a produção de IgA.
- 10- IgA neutraliza *G. duodenalis*, diminuindo a aderência à mucosa.
- 11- Células T CD4+ libertam citocinas pró-inflamatórias.
- 12- Linfócitos intra-epiteliais (principalmente células T CD8+), que desempenham funções no processo patológico intestinal.

Imagem adaptada de Lopez-Romero et al., 2015.

O diagnóstico é feito pela pesquisa de quistos ou trofozoítos nas fezes, sendo normalmente pesquisados os quistos, pois são expelidos em maior número, são mais resistentes e mais fáceis de observar. Podem usar-se técnicas de coloração para facilitar a observação (Koehler et al., 2014). A recolha de fezes deve ser feita em 3 dias, pois a expulsão de quistos pode ser intermitente. Uma amostra de fezes permite detetar 60 a 80% das infeções, ao passo que três amostras detetam mais de 90% (Gardner e Hill, 2001). Em indivíduos com baixa ou nula excreção de quistos e forte suspeita de infeção por *Giardia*, pode-

se recorrer à endoscopia com amostragem de fluidos do duodeno e biópsia (Wolfe, 1992). Testes mais recentes incluem microscopia de fluorescência, imuno-cromatografia e ensaios ELISA (imunofluorescência direta e indireta). Contudo, estes testes usam-se em estudos epidemiológicos e de controle, raramente em diagnóstico laboratorial de rotina. Até ao momento as culturas *in vitro* só se utilizam em investigação (The Center for Food Security & Public Health, 2012). Para o diagnóstico pode ainda fazer-se a pesquisa de anticorpos, mas esta apresenta baixa sensibilidade e baixa especificidade, para além de não distinguir entre infeção recente e passada (Paniker, 2013). A técnica de PCR tem sido usada para identificar os diferentes génotipos de *Giardia duodenalis* (Yaoyu e Xiao, 2011).

A prevalência da giardíase é muito diversificada, dependendo da zona geográfica: de 1 a 6% na Europa e Estados Unidos da América (sendo que nos indivíduos imunocomprometidos varia entre 3 e 14%) e nos países subdesenvolvidos, como países Africanos, Asiáticos e da América Latina a prevalência sobe para 8 a 30% (The Center for Food Security & Public Health, 2012). É ainda comum adquirir-se giardíase em viagens a zonas endémicas (Meltzer, Lachish e Schwartz, 2014).

Como acontece noutras doenças gastrointestinais, há cuidados básicos que se devem adotar em situações de giardíase, tal como ingestão adequada de fluidos e eletrólitos e dieta apropriada, isenta de lactose. A intolerância à lactose pode durar meses, pelo que a dieta deverá ter em conta este ponto, mesmo após o desaparecimento dos sintomas (The Center for Food Security & Public Health, 2012).

2.3- Prevenção

Apesar de desejado, ainda não existe uma vacina humana contra este parasita, pois *Giardia* tem a capacidade de alterar as proteínas de superfície (VSP's), conseguindo escapar ao sistema imunitário do hospedeiro (Kulakova *et al.*, 2014). Existe apenas uma vacina veterinária, GiardiaVax, composta por um lisado de células totais de isolados de ovelhas, cães e humanos. Esta vacina reduz os sintomas e a duração da eliminação de quistos (Olson, Ceri e Morck, 2000).

O tratamento da água de consumo é essencial (filtração, cloração, ozonização, iodação, irradiação UV ou fervura por 1 minuto). Não se deve ingerir água não tratada de lagos, rios, nascentes ou poços. As frutas e os legumes devem ser bem lavados e, em casos de maior risco, descascadas. Deve evitar-se consumir invertebrados aquáticos que se alimentam por filtração (marisco, mexilhão, ostras e ameijoas) pois concentram os parasitas aquando da filtração da água. O indivíduo infetado não deve nadar em águas de recreio até 2 semanas após

o final dos sintomas, para se garantir que não haja excreção de quistos. Dado que não existem fármacos profiláticos, uma higiene adequada é necessária para evitar a ingestão de quistos, sendo que lavar as mãos frequentemente é indispensável. Cuidadores de crianças e idosos devem ter especial atenção aquando da mudança da fralda. Durante a atividade sexual deve evitar-se o contato da pele e mucosas com a região anal. A compostagem das fezes animais, para uso em agricultura, pode diminuir ou eliminar os quistos. Deve prestar-se bastante atenção ao tratamento de águas residuais e esgotos (The Center for Food Security & Public Health, 2012).

3- Tratamento farmacológico da giardíase - alvos, fármacos e resistências

Apesar da giardíase ser, na maior parte das vezes, autolimitada, é muito comum verificarem-se recorrências, principalmente em áreas endêmicas, pelo que o tratamento da infeção acaba por ser necessário e importante, pois o desenvolvimento de giardíase crónica, como já foi referido, pode causar complicações, inclusive extraintestinais (Miyamoto e Eckmann, 2015).

Sendo *G. duodenalis* o parasita mais comumente encontrado no intestino humano (33% da população dos países em desenvolvimento tem história de giardíase) é de esperar que existam diversos fármacos capazes de o combater de forma eficaz, porém tal expectativa nem sempre se concretiza. Há na realidade bastantes fármacos com atividade anti-giardial, mas nem sempre são eficazes, aparecendo cada vez mais resistências (Leitsch, 2015). Outro problema é que os regimes terapêuticos exigem tratamentos prolongados e com várias administrações diárias, o que diminui a adesão à terapêutica (Miyamoto e Eckmann, 2015).

Independentemente do fármaco usado, as taxas de cura são normalmente inferiores a 100%. Para este resultado contribui não só a resistência aos fármacos mas também a especificidade do fármaco para apenas uma das fases do ciclo de vida do parasita, reinfeções, subdosagem, imunossupressão ou baixa biodisponibilidade do fármaco (Rayan *et al.*, 2015). Outros fatores menos comuns podem ser instabilidade química e/ou físico-química do medicamento, má conservação, transporte inadequado ou o uso de medicamentos falsificados. Quando ao fim de dois ciclos de tratamento não se verifica a cura da parasitose deve mudar-se de fármaco, administrando-se o novo fármaco isoladamente ou em conjunto com o primeiro. Para evitar resistências deve dar-se preferência à terapia combinada (Leitsch, 2015). Apesar de desejado, não há protocolos de tratamento pelos quais os prescritores se possam guiar para oferecer o melhor tratamento, ou o mais correto, a cada doente (Gardner e Hill, 2001).

Portadores assintomáticos não necessitam de tratamento, mas se o fizerem diminuem a excreção de quistos, o que é benéfico para limitar a propagação da doença (The Center for Food Security & Public Health, 2012).

3.1- Compostos 5-nitroimidazóis – metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol

Metronidazol é o fármaco mais usado no tratamento da giardíase. É um pro-fármaco desenvolvido em 1950, inicialmente contra o parasita *Trichomonas vaginalis* (Gardner e Hill, 2001). Logo após a sua descoberta foi testado noutros parasitas, tendo sucesso no tratamento de alguns parasitas anaeróbios ou microaerofílicos. Este sucesso terapêutico deve-se ao facto de ser um pro-fármaco que só é ativado aquando da redução do seu grupo nitro, reação que ocorre em organismos anaeróbios ou microaerofílicos com metabolismo fortemente redutor, como é o caso dos trofozoítos de *G. duodenalis* (Upcroft e Upcroft, 2001). O metronidazol entra na célula parasitária por difusão passiva (Ansell *et al.*, 2015).

Depois de reduzido, este fármaco induz a degradação do DNA e inibe a respiração do trofozoíto (Gillis e Wiseman, 1996). A ativação metabólica do fármaco origina radicais tóxicos que se vão ligar a tióis livres (como por exemplo a cisteína), formar adutos covalentes com a cisteína presente nas proteínas e interagir com a enzima redox, tioredoxina redutase, inibindo a sua função (Leitsch *et al.*, 2007). No parasita *G. duodenalis* observa-se ainda a inibição do fator de alongamento I-y, responsável pela tradução proteica (Leitsch *et al.*, 2012). Os diferentes mecanismos de ação do metronidazol culminam num stress oxidativo grave para o trofozoíto, levando à sua morte. Já no quisto não se consegue observar esta eficácia, talvez pelo facto do fármaco não conseguir atravessar a parede do quisto (Gardner e Hill, 2001).

Recomenda-se a administração de uma ou duas doses diárias, entre 5 a 10 dias, o que muitas vezes invalida a terapêutica, por falta de adesão à mesma. Por esta razão, muitas vezes recorre-se ao tinidazol, secnidazol ou ao ornidazol, que têm mecanismos de ação muito semelhantes mas usam-se em administração única, pois têm um tempo de meia vida consideravelmente maior, conseguindo assim melhor adesão à terapêutica (Leitsch, 2015).

Os efeitos secundários do metronidazol incluem dor de cabeça, vertigem, náuseas e sabor metálico. Pode observar-se neutropenia reversível e em doses elevadas, pancreatite e alterações do sistema nervoso central. O consumo de álcool concomitantemente pode exacerbar os sintomas (Gardner e Hill, 2001).

Um mecanismo de resistência ao metronidazol relaciona-se com a sua ativação *in vivo*. Organismos insensíveis a este fármaco têm, geralmente, diminuta atividade da enzima

oxidorredutase piruvato ferredoxina (PFOR) e/ou no seu co-fator. A enzima reduz a ferredoxina (co-fator) e este transfere um elétron para o metronidazol, tornando-o ativo. Quando este processo não ocorre, o pro-fármaco não se torna ativo, não exercendo a sua atividade (Narikawa, 1986). São também fatores de risco para o fracasso da terapêutica a deficiência em IgA e o doente ser portador de HIV ou doença celíaca (Nabarro *et al.*, 2015).

Os mecanismos propostos para a resistência aos fármacos 5-nitroimidazóis, no geral, são a reduzida atividade da enzima oxirredutase de ferredoxina piruvato e a alteração da expressão de genes envolvidos na resposta ao stress celular.

3.2- Composto 5-nitrotiazol - nitazoxanida

A nitazoxanida foi aprovada em 2004, nos Estados Unidos da América, para o tratamento da giardíase pediátrica. Geralmente é bem aceite, pois só é administrada 3 dias e como é fracamente absorvida no intestino, não causa grandes efeitos secundários (Leitsch, 2015). Analogicamente aos compostos 5-nitroimidazóis, a nitazoxanida é um pró-fármaco e a sua ativação ocorre através da redução do grupo nitro. Os alvos farmacológicos da nitazoxanida englobam a enzima de descarboxilação do piruvato (PFOR), a enzima nitro-reductase e uma quinona reductase (Leitsch, 2015). O comprometimento destes múltiplos alvos alteram a integridade celular, comprometendo a membrana ventral e levando à sua vacuolização (Leitsch, 2015).

A resistência a este fármaco ainda não foi observada na prática clínica, mas pode ser induzida *in vitro* (Leitsch, 2015). Nas linhas celulares resistentes verificou-se um aumento de proteínas *chaperonas*, como Hsp70, Hsp90 e Cpn60 e também de antígenos de superfície. Os níveis de PFOR não se encontravam alterados, sugerindo que culturas resistentes ao metronidazol não têm que ser resistentes à nitazoxanida (Leitsch, 2015).

3.3- Benzimidazóis – albendazol e mebendazol

Albendazol foi usado inicialmente (1983) para o tratamento de infeções helmínticas (Solaymani-Mohammadi *et al.*, 2010). Logo de seguida foi descoberto o seu potencial no tratamento da giardíase, sendo administrado numa toma diária de 400mg, durante 5 dias (Solaymani-Mohammadi *et al.*, 2010). A sua grande vantagem é que provoca menos efeitos secundários que o metronidazol, pois é pouco absorvido a nível intestinal. Porém, há evidências de teratogenicidade em ratinhos de laboratório (Solaymani-Mohammadi *et al.*, 2010).

O albendazol e o mebendazol têm como alvo a β -tubulina, principal constituinte do citoesqueleto de *Giardia duodenalis*. Ao ligarem-se à β -tubulina inibem a polimerização do citoesqueleto, induzindo defeitos estruturais graves, matando o parasita (Solaymani-Mohammadi *et al.*, 2010). Por outro lado, dificulta a captação de glicose, o que diminui a sobrevivência do trofozoíto (Gardner e Hill, 2001). Albendazol apresenta o mais amplo espectro de atividade dos fármacos deste grupo, pelo que é o escolhido quando se pretende uma administração em massa, sem diagnóstico prévio, ou em situações de poliparasitismo (Escobedo *et al.*, 2016).

A resistência ao albendazol é relativamente frequente e pode ocorrer devido a mutações no gene da β -tubulina (Aguayo-Ortiz *et al.*, 2013). Outras causas podem ser rearranjos cromossômicos, aberrações no citoesqueleto e alteração da expressão de outros genes, incluindo uma proteína VSP-like, componentes do disco ventral ou várias enzimas como a oxidase NADH e triosefosfato isomerase (Leitsch, 2015).

3.4- Nitrofuranos – furazolidona

Furazolidona é sintetizada desde que a classe dos nitrofuranos foi descoberta na década 40 (M Lindsay Grayson, 2012). É um pro-fármaco que é ativado *in vivo* pela redução do grupo nitro pela enzima NADH oxidase. Como o potencial de redução é superior ao dos compostos 5-nitroimidazóis, furazolidona é mais facilmente reduzida em condições de microaerofilia, o que a torna mais eficaz (Leitsch, 2015). Outra grande vantagem é a possibilidade de formular uma suspensão líquida, mais compatível a nível pediátrico, apesar de ser necessário administrar-se entre 7 a 10 dias, quatro vezes ao dia (Lerman e Walker, 1982; Leitsch, 2015). Em relação ao mecanismo de ação, a furazolidona causa danos em proteínas e no DNA (Leitsch, 2015).

A resistência à furazolina parece estar associada à alteração na atividade da enzima NADH oxidase, mas tal não se verificou em isolados de *G. duodenalis* resistentes (Leitsch, 2015). Observou-se, porém, um aumento nas enzimas peroxiredoxina e tioredoxina redutase, tornando o parasita mais tolerante às espécies reativas de oxigênio (Leitsch, 2015). Uma outra possibilidade é a redução da quantidade de fármaco que penetra a membrana do trofozoíto (Gardner e Hill, 2001).

3.5- Quinacrina (mepacrina)

Quinacrina é um derivado de acridina e apresenta uma boa eficácia no tratamento da giardíase (90%) (Miyamoto e Eckmann, 2015). Foi originalmente aprovado como antimalárico e após a Segunda Guerra Mundial passou a ser usado no tratamento da giardíase (Gardner e Hill, 2001). Apesar da sua elevada eficácia (superior a 90%), o facto de ter que se administrar durante 5 a 10 dias acrescido do facto de causar efeitos secundários desagradáveis (náuseas e descoloração cutânea) tornam este fármaco uma escolha pouco usual. No entanto, quando a monoterapia falha é usado como escolha de segunda linha terapêutica em combinação com metronidazol ou albendazol (Ehsanian, Waes, Van e Feller, 2011).

Quanto ao seu mecanismo de ação tudo indica que inibe a síntese do ácido nucleico através da sua inserção no DNA, apesar de não existirem evidências que se acumule no núcleo. Por outro lado, existem evidências que também induz stress oxidativo na célula (Ehsanian, Waes, Van e Feller, 2011). *In vitro* observou-se uma redução da viabilidade dos quistos, assim como uma diminuída taxa de desenquistação (Gardner e Hill, 2001).

3.6- Aminoglicosídeos – paromomicina

Em 1989 verificou-se a eficácia da paromomicina no tratamento de *G. duodenalis* (Edlind, 1989). No entanto, a atividade anti-*Giardia* não é constante, chegando mesmo a não ter efeito farmacológico (Edlind, 1989). Mesmo assim é utilizado pois apresenta a vantagem de ser pouco absorvido a nível intestinal, tornando-o seguro para ser utilizado durante a gravidez (Gardner e Hill, 2001). Apesar da flutuação de eficácia, paromomicina pode ser útil, em combinação com o metronidazol quando estamos perante uma infeção resistente, sendo portanto uma combinação útil como segunda linha de tratamento (Nash, 2013).

A paromomicina inibe a síntese proteica e interfere com as subunidades 50S e 30S ribossomal, levando a uma leitura errada dos codões de mRNA (Gardner e Hill, 2001).

3.7- Polipeptídeo – bacitracina-zinco

No ano 1994 descobriu-se que o antibiótico bacitracina era ativo contra *G. duodenalis* (Andrews BJ, Panitescu D, Jipa GH, Vasile-Bugarin AC, Vasiliu RP, 1995). Um grande inconveniente associado a este antibiótico é a necessidade de realizar a terapêutica durante 10 dias consecutivos, o que diminui a adesão à terapêutica, diminuindo a eficácia e aumentando a resistência do parasita à bacitracina (Andrews BJ, Panitescu D, Jipa GH, Vasile-Bugarin AC, Vasiliu RP, 1995).

Associar zinco à bacitracina tem demonstrado uma eficácia 5 a 10 vezes superior do que a administração isolada de bacitracina (Astiazarán-García *et al.*, 2015).

Fisiologicamente o zinco participa em eventos de sinalização intracelular, regulação da apoptose, metabolismo do ADN e RNA, expressão génica, modulação imunitária, síntese proteica e regulação enzimática, sendo particularmente importante em órgãos com extensa divisão celular, sistema imunitário e intestinos. A giardíase compromete o metabolismo do zinco, diminuindo a imunidade inata e adaptativa e promovendo a síntese de citocinas inflamatórias (Astiazarán-García *et al.*, 2015). A suplementação com zinco diminui a taxa de diarreia causada por *G. duodenalis*, não só pela sua importância fisiológica, mas também pelo facto de este se ligar às diferentes VSP's presentes na superfície e nos flagelos do parasita (Astiazarán-García *et al.*, 2015).

O recurso a suplementos com zinco pode prevenir, controlar e ajudar a tratar doenças diarreicas infantis, sendo importante para a saúde pública, principalmente em áreas endémicas (Astiazarán-García *et al.*, 2015).

4- Fármacos aprovados para outras situações que estão em estudo quanto à atividade anti-giardial

Apesar do grande número de fármacos aprovados para o tratamento da giardíase observa-se hoje um problema, falta de eficácia farmacológica, principalmente em países endémicos. Outro grave problema é a falta de adesão à terapêutica e a existência de efeitos secundários por vezes acentuados. Por estas razões, procura-se cada vez mais descobrir moléculas que possam ser úteis no tratamento da giardíase. A pesquisa de moléculas novas é cara, morosa e nem sempre leva a bons resultados. Por esta razão, observa-se hoje em dia (não só para a giardíase) a uma “reciclagem de moléculas antigas” no sentido de descobrir novas atividades terapêuticas (Kulakova *et al.*, 2014; Escobedo *et al.*, 2015).

4.1- Auronofina

Auronofina é um fármaco aprovado atualmente para o tratamento da artrite reumatoide (Tejman-Yarden *et al.*, 2013). Curiosamente verificou-se que inibe o crescimento e a sobrevivência de diversos isolados de *G. duodenalis* (Tejman-Yarden *et al.*, 2013). Uma descoberta interessante e bastante importante relaciona-se com o facto de este fármaco conseguir atuar contra isolados resistentes ao metronidazol (Tejman-Yarden *et al.*, 2013). Existem evidências de que o mecanismo de ação é semelhante aos compostos 5-

nitroimidazóis, inibição da tiorredoxina oxidorreductase, crucial na regulação do stress oxidativo do parasita (Tejman-Yarden *et al.*, 2013).

4.2- Fumaligina

Fumaligina é usada para o tratamento de infecções intestinais por microsporídeos protozoários *Enterocytozoon bieneusi* em pacientes imunocomprometidos (Champion *et al.*, 2010). No seguimento de um screening realizado a várias moléculas descobriu-se que a fumaligina pode ter interesse no tratamento da giardíase (Leitsch, 2015). Fumaligina apresentou eficácia similar ou superior que o metronidazol na erradicação de *G. duodenalis*, tendo demonstrado, também, atividade em isolados de *Giardia* resistentes ao metronidazol (Kulakova *et al.*, 2014).

Quando administrado por via sistémica apresenta efeito inibitório sobre a angiogénese (Ingber *et al.*, 1990), porém, por via oral, a sua biodisponibilidade é reduzida, ficando o fármaco concentrado no lúmen intestinal, onde pode atuar diretamente sobre o parasita e evitar os efeitos indesejáveis resultantes da administração por via sistémica (Lijnen, Frederix e Hoef, Van, 2010). Quanto ao seu mecanismo de ação, fumaligina inibe a aminopeptidase-2-metionina (MetAP2) (Fahey, 1963). Os eucariotas codificam MetAPI e MetAP2, mas *G. duodenalis*, apesar de ser um ser eucariota, possui apenas MetAP2, razão pela qual fumaligina atua sobre o parasita. O fármaco pode ser alterado perto do local ativo, de forma a ser mais seletivo para o parasita (Kulakova *et al.*, 2014).

4.3- Cloroquina

Cloroquina foi um fármaco sintetizado pela primeira vez em 1934, com a substituição do anel de acridina da quinacrina por um anel de quinolina (Escobedo *et al.*, 2015). Foi introduzido na terapêutica contra a malária. Atualmente usa-se como terapia de segunda linha na amebíase extraintestinal, HIV, sarcoidose, artrite reumatoide, lúpus eritematoso e na sensibilização de células cancerígenas à radiação e aos agentes quimioterápicos (Escobedo *et al.*, 2015).

Apresenta também atividade anti *Giardia*, apesar do mecanismo de ação não ser totalmente conhecido acredita-se que se relaciona com a inibição da adesão do trofozoíto à mucosa intestinal. Outra possibilidade é o fármaco causar a diminuição do consumo de oxigénio nos trofozoítos (provavelmente por inibir a NADH oxidase). O tratamento com cloroquina induz ainda danos na membrana, liga-se ao DNA e diminui a taxa de enquistamento (Escobedo *et al.*, 2015).

Estudos recentes indicam que é um fármaco seguro e eficaz (taxa de cura de 86%), muito semelhante ao metronidazol. Apresenta alguns efeitos secundários como dor de cabeça e prurido. Em tratamentos prolongados pode induzir alopecia, discrasias sanguíneas, neuromiopatias, surdez e lesões na córnea e retina (Escobedo et al., 2015).

Podemos concluir que estamos perante um fármaco que se pode revelar muito útil no tratamento da giardíase, pois os seus efeitos secundários são já conhecidos e é relativamente barato. Será então útil realizarem-se mais estudos a fim de determinar a dose mínima eficaz e a duração do tratamento, para que cloroquina seja introduzida na terapêutica contra a giardíase (Escobedo et al., 2015).

4.4- Orlistato

Orlistato é um fármaco aprovado para o controlo da obesidade. É um inibidor da lipase, impedindo a captação de lípidos, indispensáveis ao rápido crescimento de *G. duodenalis*. Verifica-se assim uma inibição da replicação de *G. duodenalis*, dose dependente. Uma grande vantagem deste fármaco é o facto de ser fracamente absorvido, exercendo a sua atividade localmente e sendo posteriormente eliminado nas fezes. O seu maior inconveniente (ou efeito secundário) relaciona-se com a inibição de absorção de lípidos ou de outros fármacos com carácter lipofílico (Hahn et al., 2013).

4.5- Miltefosine

Miltefosine foi inicialmente aprovado como anticancerígeno (Dorlo et al., 2012) e mais tarde contra o parasita *Leishmania donovani* (Dorlo et al., 2012). É um éster fosfocolina de álcoois alifáticos com cadeia longa. É semelhante ao grupo de alquil-lisofosfolípidos, que é um análogo sintético da lisofosfatidilcolina ou lisolecitinas, apenas não contém o esqueleto glicerol (Dorlo et al., 2012). Inibe a proteína-quinase B (PKB), proteína fundamental na sinalização intracelular que está envolvida na sobrevivência da célula (Dorlo et al., 2012) e provoca a morte celular por diferentes mecanismos apoptóticos (citoplasmáticos, nucleares e membranares). Recentemente demonstrou-se a sua eficácia no tratamento da giardíase, apresentando atividade anti-giardial *in vitro* e eficácia num modelo animal (Eissa e Amer, 2012).

4.6- Omeprazol

Um dos mais importantes inibidores da bomba de prótons (inibição irreversível) demonstrou potencial anti-giardial (Reyes-Vivas et al., 2014).

Dado o facto de *G. duodenalis* não apresentar fosforilação oxidativa, as enzimas da via glicolítica são alvos farmacológicos muito atrativos, pois o seu bloqueio irá resultar na morte do parasita (Reyes-Vivas *et al.*, 2014).

O omeprazol interage com a cisteína da posição 222 da triose-fosfato isomerase de *G. duodenalis*, inativando esta enzima. Tudo indica tratar-se de um fármaco muito promissor pois é eficaz mesmo em culturas de *Giardia* nitazoxanida-resistentes. O omeprazol (e seus isómeros) atua tanto em pH ácido como em pH neutro, mas tem de atravessar a membrana parasitária para chegar ao citoplasma dos trofozoítos, local onde exerce a sua atividade. Apesar de ser uma escolha promissora prevêem-se já alguns mecanismos de resistência, como redução da permeabilidade da membrana e aprisionamento do fármaco a resíduos de cisteína presentes nas VSP's (Reyes-Vivas *et al.*, 2014). A mutagénese não altera a atividade ou estabilidade da enzima, isto é, podem ocorrer mutações em qualquer um dos cinco resíduos de cisteína da enzima que a sua constante cinética se mantém. Este facto pode ser um obstáculo uma vez que o omeprazol só atua no resíduo 222 de cisteína e a enzima poderá sofrer alterações neste resíduo sem prejuízo para a sua atividade (Reyes-Vivas *et al.*, 2014).

4.7- Outros

Vários fármacos com potencial anti-giardial, entre os quais o carbadox (usado na veterinária na terapêutica anti-giardial), tioxidazole, riboflavina butirato (derivado da vitamina B12) e dissulfiram (utilizado no alcoolismo crónico inibe a enzima carbamato cinase do parasita) foram identificados (Kulakova *et al.*, 2014).

5- Perspetivas futuras para o tratamento da giardíase - pesquisa de novos fármacos e possíveis alvos

Para melhorar as alternativas terapêuticas contra *G. duodenalis* deve-se ter em conta não só a alteração de moléculas já existentes mas também pensar em novos alvos terapêuticos possíveis (enzimas essenciais, proteínas, membranas ou outras estruturas/moléculas importantes) e tentar desenvolver ou pesquisar fármacos que atuem sobre estes alvos.

5.1- 2-aryl-3-hidroxiimidazolo [1,2-a] piridina e pirimidina

Tal como já foi referido, os compostos benzimidazóis atuam por interação com a β -tubulina, causando deformações estruturais no parasita que resultam na sua morte.

Observou-se que o núcleo benzimidazol é muito semelhante ao núcleo imidazo [1,2-a] piridina e pirimidina, tanto estrutural como eletronicamente. Perante este facto procedeu-

se à substituição do núcleo imidazo [1,2-a], afim de estudar a sua atividade sobre *G. duodenalis*, assim como a sua toxicidade sobre o hospedeiro. De catorze derivados analisados houve três que apresentaram melhor atividade contra *Giardia* - os derivados 2-a, 2-b e 2-c do composto 2-aril-3hidroximetilimidazo[1,2-a] piridina e pirimidina (Velázquez-olvera, Salgado-zamora e Jiménez-cardoso, 2016).

Apesar de ser um estudo preliminar, tudo indica que combinar estes compostos com o albendazole possa potenciar o efeito letal sobre *G. duodenalis* (Velázquez-olvera, Salgado-zamora e Jiménez-cardoso, 2016).

5.2-Composto anti tumoral NBDHEX (6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-tieniltio)hexanol)

Nas mitocôndrias humanas existe uma enzima, glicero-3-fosfato desidrogenase FAD dependente (mG3PD), crucial no processo de obtenção de energia. Esta enzima faz parte da cadeia transportadora de elétrons podendo gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Uma atividade descontrolada desta enzima pode conduzir ao aparecimento e crescimento de tumores indiferenciados. Descobriu-se recentemente que o composto 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiol-4-tieniltio)hexanol) (NBDHEX) interfere com a atividade desta enzima, tendo atividade anti tumoral (Lalle *et al.*, 2015).

O parasita *G. duodenalis*, apesar de não ser portador de mitocôndrias, apresenta os mitossomas, organelos muito semelhantes à mitocôndria humana. Apresenta também uma enzima homóloga (gG3PD), crucial no processo de obtenção de energia, tanto em meio aeróbio como em meio anaeróbio. Dada a homologia entre mG3PD e gG3PD fez-se um estudo para avaliar a atividade anti giardial do composto NBDHEX, tendo-se obtido resultados promissores (Lalle *et al.*, 2015).

5.3- Análogos das purinas

Estudos indicam que *G. duodenalis* é incapaz de sintetizar nucleótidos, dependendo do hospedeiro para a síntese do ácido nucleico. Do mesmo modo, este parasita é incapaz de realizar a interconversão entre os nucleótidos de purina (adenina e guanina) (Baum, Berens e Marr, 1993). A via metabólica das purinas no parasita é simples: os nucleósidos são clivados e em seguida fosforilados a monofosfatos de nucleótidos (Baum, Berens e Marr, 1993). Análogos de purina são potenciais fármacos para o tratamento da giardíase, pois incorporam-se no ADN durante a replicação, levando ao desemparelhamento do DNA e impede a proliferação de *Giardia duodenalis* (Rayan *et al.*, 2015).

Como exemplo pode referir-se a formicina A, arabinósido de adenina e 7-deadenosina (Baum, Berens e Marr, 1993). Os análogos das purinas entram na célula por um transportador de nucleobases ou por difusão passiva (Baum, Berens e Marr, 1993).

5.4- Moléculas com capacidade de induzir stress nitrosativo

Várias são as moléculas capazes de induzir stress nitrosativo no trofozoíto de *G. duodenalis*. O s-nitroso-acetil-penicilamina, o nitroprussiato de sódio, o sal de Roussin preto e o nitrito são algumas dessas moléculas. Os mecanismos de ação podem passar por causar a diminuição do potencial de membrana, induzir alterações morfológicas, alterar a capacidade do parasita para consumir oxigênio, diminuir a atividade flagelar ou aumentar a suscetibilidade ao stress osmótico, podendo culminar na morte parasitária (Lloyd et al., 2003).

5.5- Extratos de *Terminalia ferdinandiana*, *Corniculata oxalis*, *Osvris alba* e óleos essenciais

Observa-se hoje em dia ao renascer do interesse pela fitoterapia. Por um lado porque se acredita que possa implicar menos reações adversas, por outro lado porque num alimento, numa planta ou num fruto estão presentes muitos compostos, sendo que muitos deles atuam sinergicamente por mecanismos diferentes, diminuindo as resistências parasitárias e aumentando o sucesso do tratamento (Rayan et al., 2015).

O fruto de *Terminalia ferdinandiana* é usado, na maioria das vezes, na obtenção de vitamina C, pois é rico neste constituinte. Para além da vitamina C salienta-se, ainda, o seu conteúdo em ácidos benzoicos, flavonoides, flavononas, ácido gálico e elágico, luteína, vitamina E e seus derivados (Konczak et al., 2010).

Dada a versatilidade de compostos existentes neste fruto avaliou-se a atividade de diferentes extratos na proliferação de *Giardia duodenalis*. Os resultados obtidos indicam uma eficácia dose-dependente, independentemente do extrato testado (Rayan et al., 2015). Os extratos do fruto, os extratos metanólicos e aquosos inibiram 100% o crescimento do parasita, enquanto que os extratos com acetato de etilo e clorofórmio foram menos ativos. Já com o extrato hexânico não se observou atividade anti-giardial (Rayan et al., 2015). O estudo realizado demonstrou que os extratos de *Terminalia ferdinandiana* poderão ser úteis tanto no tratamento como na prevenção de infeções por *G. duodenalis* (Rayan et al., 2015).

Corniculata oxalis é uma planta que nasce espontaneamente na Índia e é usada no tratamento de diarreia. Com base neste uso tradicional procedeu-se ao fracionamento dos extratos desta planta, obtendo-se um composto glicerolípido (Manna et al., 2010). Este

composto apresentou atividade anti-giardial semelhante ao metronidazol, tendo a vantagem de não apresentar toxicidade sobre as células humanas (Manna *et al.*, 2010).

Outra planta, *Osvris alba* (também conhecida por sândalo) usada tradicionalmente na Jordânia, foi alvo de estudos fitoquímicos (Al-Jaber *et al.*, 2010) e descobriu-se um composto alcaloide pirrolizidínico, com elevada atividade contra *Giardia duodenadis* e não tóxico para as células humanas (Al-Jaber *et al.*, 2010).

Também os óleos essenciais suscitam o interesse para a terapêutica antiparasitária. Utilizados desde a Idade Média, têm efeito antisséptico, são bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitários e inseticidas, têm aplicação medicinal e cosmética (Bakkali *et al.*, 2008). São extraídos de plantas aromáticas e contém um grande número de componentes, pelo que não têm alvos celulares específicos (Bakkali *et al.*, 2008).

Tal como nos casos de stress oxidativo ou de insuficiência bioenergética, observa-se que os óleos essenciais induzem uma perda de radicais, citocromo C, iões cálcio e proteínas, devido ao aumento da permeabilidade das membranas (Bakkali *et al.*, 2008). Os óleos essenciais mais ativos em *Giardia duodenalis* foram os fenólicos, principalmente os que contém carvacrol (*Thymbra capitata* e *Origanum virans*) (Machado *et al.*, 2010).

5.6- Galotaninos, compostos com uma unidade lactona ou com ácido quínico

Galotaninos são compostos fenólicos capazes de inibir o crescimento de várias espécies microbianas por diversos mecanismos, como ligação à superfície celular (lipotoichoic acid and proline-rich cell surface proteins) (Hogg e Embery, 1982) e inibição da enzima glicosiltransferase (Wu-Yuan, Chen e Wu, 1988).

G. duodenalis não é capaz de sintetizar lípidos, pelo que usa os lípidos intestinais, alterando-os por reações de desacilação/re-acilação para os integrarem na sua membrana. Os compostos com uma unidade lactona inibem as reações de desacilação/re-acilação, pelo que podem ser úteis na inibição do crescimento do parasita (Das, Castillo e Stevens, 2001).

Outros compostos possivelmente úteis são os que contém ácido quínico, pois inibem a sintase do leucil tRNA (Zhang *et al.*, 2012). Esta enzima é responsável pela correta tradução do código genético, codifica o aminoácido correto para cada tRNA. Quando esta enzima está inibida há uma inibição da síntese proteica (Rayan *et al.*, 2015).

5.7- Outros

Outros compostos demonstraram atividade em *G. duodenalis*. Destes compostos podem enumerar-se DL-propranolol, própolis, óleo de girassol ozonizado, formononetina e pentamidinas (Leitsch, 2015).

5.8- Alvos terapêuticos

O desenvolvimento de novos fármacos tem como base o estudo do metabolismo e biologia do parasita identificando-se o que é crucial para a sua sobrevivência.

Uma característica de *Giardia duodenalis* é o facto do seu metabolismo ser fermentativo, o transporte de eletrões ocorre na ausência de fosforilação oxidativa mitocondrial. O parasita é microaerófilo, tem sistemas que lhe permitem transformar o oxigénio molecular e assim sobreviver na presença de pequenas quantidades de oxigénio (Miyamoto e Eckmann, 2015). Apesar de não conter os sistemas enzimáticos antioxidantes convencionais (catalase, superóxido dismutase e glutathione transferase) (Brown, Upcroft e Upcroft, 1995) o parasita é portador de sistemas antioxidantes próprios que o protegem do stress oxidativo, até porque no intestino delgado proximal, área que o parasita coloniza, o ambiente contém ainda vestígios de oxigénio (Espey, 2013). Em laboratório o parasita cresce preferencialmente em condições anaeróbias e ambiente redutor. *Giardia* possui enzimas que são inativadas na presença de oxigénio, ao passo que outras produzem ROS (Li e Wang, 2006).

Um possível alvo é a enzima arginina dihidrolase, responsável pela formação de ATP e indispensável à sobrevivência do trofozoíto (Knodler *et al.*, 1998). Por outro lado, esta enzima permite ao trofozoíto escapar da resposta imune do hospedeiro, pois esgota os níveis de arginina humana, funcionando como fator de virulência (Eckmann *et al.*, 2000). Este é um alvo interessante e promissor, uma vez que está presente no parasita mas ausente do hospedeiro humano (Miyamoto e Eckmann, 2015).

Outro alvo poderá ser a enzima carbamato cinase, responsável pela conversão de ADP e carbamoilfosfato a ATP e carbamato. Tal como a enzima anterior, também esta é indispensável ao parasita mas ausente do hospedeiro humano, o que se torna uma vantagem principalmente ao nível dos efeitos secundários da terapêutica (Minotto *et al.*, 1999).

Uma outra enzima envolvida na via glicolítica, indispensável à obtenção de energia por parte de protozoários sem mitocôndria é a frutose 1,6-bifosfato aldolase. Esta enzima é responsável pela clivagem de D-frutose-1,6-bifosfato a di-hidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (Li *et al.*, 2011). Mais uma vez estamos perante um alvo somente presente no parasita e não no hospedeiro humano (Miyamoto e Eckmann, 2015).

Entre as enzimas antioxidantes encontra-se a superóxido redutase. Esta contém ferro não heme que na presença de um dador de eletrões degrada o anião superóxido a peróxido de hidrogénio, como forma de proteger o parasita do stress oxidativo. Como o peróxido de hidrogénio é letal para o parasita (inibe o consumo de oxigénio, esgota o pool de tióis celular, induz perda de potencial de membrana, degradação proteolítica da flavoproteína e morte celular programada) existe um grupo de enzimas (peroxidases ubíquas dependentes de cisteína) que reduzem o peróxido de hidrogénio a água, assim como reparam os danos oxidativos da célula parasitária. Interferir com qualquer uma destas enzimas (superóxido redutase e peroxidases ubíquas) pode implicar stress oxidativo para o parasita, podendo ser benéfico para a sua erradicação (Mastronicola *et al.*, 2015).

Outra enzima de especial relevo, que poderá ser um alvo promissor, é a NADH oxidase que usa o FAD como cofator (Brown, Upcroft e Upcroft, 1996). Esta enzima parece funcionar como uma oxidase terminal, participando na “respiração” do parasita. NADH oxidase usa o NADH como dador de eletrões para converter oxigénio molecular em água, limitando a formação de ROS, causando assim menor stress oxidativo à célula. Interferindo com esta enzima pode-se conseguir uma maior perturbação no parasita e provocar a sua morte (Brown, Upcroft e Upcroft, 1996).

Tudo indica que o parasita tem uma flavoproteína (FDP) capaz de catalisar a conversão de oxigénio molecular a água e converter óxido nítrico a nitrato (Mastronicola *et al.*, 2015). Ambas as reações protegem *G. duodenalis* de stress oxidativo. Interferindo com esta enzima pode-se também contribuir para a inviabilidade dos trofozoítos, conseguindo assim combater a infeção (Mastronicola *et al.*, 2015).

O parasita possui também uma flavohemoglobina (Flavo Hb) que cataliza a degradação de óxido nítrico a nitrato usando oxigénio como co-substrato (Gardner *et al.*, 1998). Esta enzima obtém os eletrões necessários a partir do NAD(P)H e usa como cofator (recetor de eletrões) o FAD. A enzima protege *G. duodenalis* do stress nitrosativo, podendo ser um futuro alvo para novos fármacos. É de notar que esta Flavo Hb possui duas nitro-redutases, NR1 que se comporta como ativador de fármacos nitro e NR2 como inativador. Assim, dependendo da nitro-redutase em questão, pode-se ter suscetibilidade ou resistência a fármacos com grupo nitro (Müller *et al.*, 2007; Nillius, Müller e Müller, 2011; Müller, Schildknecht e Müller, 2013).

5.9- Interação com o hospedeiro

Poderá ser possível estimular o hospedeiro para que este se proteja do parasita e tenha um papel ativo na sua erradicação. Uma alternativa é interagir com a enzima óxido nítrico

sintetase do hospedeiro (NOS-I). *G. duodenalis* inibe a produção de óxido nítrico no hospedeiro através do consumo de arginina pelo parasita (NOS parasitária). Este consumo de arginina, quando excessivo, leva à produção não de óxido nítrico (pelas células epiteliais do hospedeiro) mas sim de ROS, prejudiciais para o parasita mas também para o hospedeiro. Uma possibilidade para o auxílio terapêutico poderá ser o estímulo da NOS-I, aumentando os níveis de óxido nítrico no hospedeiro, o que irá favorecer a motilidade gástrica e a eliminação de trofozoítos (Mastronicola *et al.*, 2015). Na minha opinião este estímulo não será muito benéfico, pois poderá causar alguns efeitos indesejáveis, uma vez que se interfere com o hospedeiro e não com o parasita propriamente dito.

Conclusão

Apesar de na maior parte dos casos (60 a 80%) a giardíase ser assintomática, esta patologia continua a ser preocupante. Em Portugal estima-se uma taxa de infeção de 3,7%, sendo este valor provavelmente inferior ao real devido à subnotificação. A prevalência é muito diversificada: 1 a 6% na Europa e Estados Unidos da América (sendo que nos indivíduos imunocomprometidos varia entre 3 e 14%) e nos países subdesenvolvidos, como países Africanos, Asiáticos e da América Latina a prevalência sobe para 8 a 30%.

Como ainda não existe uma vacina humana preventiva, em muito pela capacidade que o parasita tem de alterar as proteínas específicas de superfície (VSP's), as boas práticas de higiene, a atenção com a água e os com alimentos que se ingerem são as medidas de prevenção.

Apesar da maioria dos casos não ser sintomáticos e da giardíase ser uma doença autolimitada, a excreção de quistos é altíssima (200000 por grama de fezes) e uma vez que são extremamente resistentes, a propagação da doença é rápida e fácil. É por esta razão que muitas vezes se institui o tratamento de indivíduos assintomáticos, para diminuir a excreção de quistos e assim tentar controlar a propagação da infeção.

Existem bastantes fármacos aprovados para o tratamento de *Giardia duodenalis*, porém nenhum é 100% eficaz. Os fármacos mais usados são os compostos 5-nitroimidazóis e os benzimidazóis, principalmente o metronidazol (5-NI) e o albendazol. O albendazol é particularmente útil para tratamentos em massa ou quando não existe um diagnóstico prévio, pois é o fármaco com maior espectro de atividade. Outros fármacos usados são a nitazoxanida, a furazolidona, quinacrina, paramomicina e bacitracina-zinco.

Apesar de existirem várias opções terapêuticas, nenhuma delas é perfeita, principalmente em crianças e grávidas. Os regimes terapêuticos são muitas vezes complexos e demorados, levando ao abandono da terapêutica. Os efeitos secundários são, muitas vezes,

desagradáveis de mais para o doente prosseguir com a terapêutica. Observa-se, ainda, a um crescente desenvolvimento de resistência aos fármacos e reinfeções.

Procura-se constantemente melhorar e inovar as opções terapêuticas para o tratamento da giardíase. Com *screenings* a moléculas já existentes consegue-se, muitas vezes, encontrar autênticos achados. É o caso da auronofina, da fumaligina, da cloroquina, do orlistato, da miltefosine e do omeprazol. Estes fármacos estão já aprovados para outras patologias, mas descobriu-se agora uma nova atividade para eles. Esta pesquisa, para além de ser mais rápida e mais económica que a pesquisa convencional de moléculas, tem ainda a vantagem de serem fármacos com um perfil de segurança já conhecido.

Apesar de tudo é necessário continuar a investigação no sentido de encontrar fármacos mais eficazes e mais seguros. Nesse sentido procuram-se alvos que sejam essenciais ao parasita, que não sejam alteráveis/mutáveis e que não estejam presentes no homem, como por exemplo arginina dihidrolase, cinase do carbamato, D-frutose 1,6-bifosfato, superóxido redutase, NADH oxidase, flavoproteína e flavohemoglobina. O passo seguinte é encontrar ou desenvolver moléculas que interfiram com estes alvos, de forma a bloquear a sua normal atividade.

Outros compostos estão em estudo quanto à sua atividade anti-giardial, como é o caso do composto NBDHEX e de alguns análogos das purinas.

Observa-se ainda o renascer da fitoterapia. Talvez por se acreditar que provoca menos efeitos secundários procura-se hoje em dia recorrer às plantas de forma a obter resposta para os problemas existentes. O uso de extratos de plantas pode ser muito vantajoso, pois são retirados da planta vários constituintes que podem ter um efeito sinérgico, potenciando assim a sua ação.

Muitas descobertas já estão feitas, mas nenhuma satisfaz plenamente as necessidades atuais. É necessário prosseguir com a investigação, tanto no sentido de desenvolver moléculas novas para alvos essenciais e únicos do parasita como no sentido de dar nova vida a moléculas já usadas para outros fins.

Referências bibliográficas

- AGUAYO-ORTIZ, Rodrigo *et al.* - Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. ISSN 10933263. 45:2013) 26–37. doi: 10.1016/j.jmgm.2013.07.008.
- AL-JABER, Hala I. *et al.* - Chemical constituents of *Osyris alba* and their antiparasitic activities. **Journal of Asian Natural Products Research**. ISSN 1477-2213. 12:October 2014 (2010) 814–820. doi: 10.1080/10286020.2010.502892.
- ANDREWS BJ , PANITESCU D , JIPA GH , VASILE-BUGARIN AC , VASILIU RP, Ronnevig JR - Chemotherapy for giardiasis: randomized clinical trial of bacitracin, bacitracin zinc, and a combination of bacitracin zinc with neomycin. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 1995) 318–321.
- ANSELL, Brendan R. E. *et al.* - Drug resistance in *Giardia duodenalis*. **Biotechnology Advances**.ISSN 07349750. 33:6 (2015) 888–901. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.009.
- ASTIAZARÁN-GARCÍA, Humberto *et al.* - Crosstalk between Zinc Status and *Giardia* Infection: A New Approach. **Nutrients**. . ISSN 2072-6643. 7:6 (2015) 4438–4452. doi: 10.3390/nu7064438.
- BAKKALI, F. *et al.* - Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 46:2 (2008) 446–475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- BAUM, Kenneth F.; BERENS, Randolph L.; MARR, J. Joseph - Purine Nucleoside and Nucleobase Cell Membrane Transport in. **J. Euk. Microbiol**. 40:5 (1993) 643–649.
- BROWN, D. M.; UPCROFT, J. A; UPCROFT, P. - A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **European journal of biochemistry / FEBS**. . ISSN 0014-2956. 241:1 (1996) 155–61.
- BROWN, David M.; UPCROFT, Jacqueline A.; UPCROFT, Peter - Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. . ISSN 01666851. 72:1-2 (1995) 47–56. doi: 10.1016/0166-6851(95)00065-9.
- CHAMPION, L. *et al.* - Fumagillin for treatment of intestinal microsporidiosis in renal transplant recipients. **American Journal of Transplantation**. . ISSN 16006135. 10:8 (2010) 1925–1930. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03166.x.
- COTTON, James A.; AMAT, Christina B.; BURET, Andre G. - Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. **Pathogens**. . ISSN 2076-0817. 4:4 (2015) 764–92. doi: 10.3390/pathogens4040764.
- DAS, Siddhartha; CASTILLO, Cynthia; STEVENS, Tamara - Phospholipid

- remodeling/generation in *Giardia*: The role of the Lands cycle. **Trends in Parasitology**. . ISSN 14714922. 17:7 (2001) 316–319. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01901-8.
- DORLO, Thomas P. C. et al. - Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 67:11 (2012) 2576–2597. doi: 10.1093/jac/dks275.
- ECKMANN, L. et al. - Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)**. . ISSN 0022-1767. 164:3 (2000) 1478–1487. doi: 10.4049/jimmunol.164.3.1478.
- EDLIND, T. D. - Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: Correlation with rRNA structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 00664804. 33:4 (1989) 484–488. doi: 10.1128/AAC.33.4.484.
- EHSANIAN, Reza; WAES, Carter VAN; FELLER, Stephan M. - Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. **Cell communication and signaling □: CCS**. . ISSN 1478-811X. 9:1 (2011) 13. doi: 10.1186/1478-811X-9-13.
- EISSA, Maha M.; AMER, Eglal I. - *Giardia lamblia*: A new target for miltefosine. **International Journal for Parasitology**. . ISSN 00207519. 42:5 (2012) 443–452. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.02.015.
- ESCOBEDO, Angel et al. - Chloroquine: An Old Drug with New Perspective Against Giardiasis. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**. . ISSN 1574891X. 10:2 (2015) 134–141. doi: 10.2174/1574891X10666150914122118.
- ESCOBEDO, Angel A. et al. - A meta-analysis of the efficacy of albendazole compared with tinidazole as treatments for *Giardia* infections in children. **Acta Tropica**. . ISSN 18736254. 153:616 (2016) 120–127. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.09.023.
- ESPEY, Michael Graham - Role of oxygen gradients in shaping redox relationships between the human intestine and its microbiota. **Free Radical Biology and Medicine**. . ISSN 08915849. 55:2013) 130–140. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.554.
- FAHEY, J. L. - Structural Basis for the Differences Between Type I and Type II Human Gamma-Globulin Molecules. **Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)**. 91:1963) 448–459.
- FAUBERT, G. - Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clinical microbiology reviews**. . ISSN 0893-8512. 13:1 (2000) 35–54, table of contents. doi: 10.1128/CMR.13.1.35-54.2000.

- GARDNER, Paul R. *et al.* - Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 0027-8424. 95:September (1998) 10378–10383. doi: 10.1073/pnas.95.18.10378.
- GARDNER, Timothy B.; HILL, David R. - Treatment of Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**. 14:1 (2001) 114–128. doi: 10.1128/CMR.14.1.114.
- GILLIS, J. C.; WISEMAN, L. R. - Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**. . ISSN 0012-6667. 51:4 (1996) 621–38.
- GOTTIG, Natalia *et al.* - Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Journal of Biological Chemistry**. . ISSN 00219258. 281:26 (2006) 18156–18166. doi: 10.1074/jbc.M602081200.
- HAHN, Juliane *et al.* - High Sensitivity of *Giardia duodenalis* to Tetrahydrolipstatin (Orlistat) In Vitro. **PLoS ONE**. . ISSN 1932-6203. 8:8 (2013) e71597. doi: 10.1371/journal.pone.0071597.
- HOGG, S. D.; EMBERY, G. - Blood-group-reactive glycoprotein from human saliva interacts with lipoteichoic acid on the surface of *Streptococcus sanguis* cells. **Archives of Oral Biology**. . ISSN 00039969. 27:3 (1982) 261–268. doi: 10.1016/0003-9969(82)90060-7.
- INGBER, D. *et al.* - Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. **Nature**. . ISSN 0028-0836. 348:6301 (1990) 555–557. doi: 10.1038/348555a0.
- JERLSTRÖM-HULTQVIST, Jon; ANKARKLEV, Johan; SVÄRD, Staffan G. - Is human giardiasis caused by two different *giardia* species? **Gut Microbes**. . ISSN 19490976. 1:6 (2010) 379–382. doi: 10.4161/gmic.1.6.13608.
- KNODLER, Leigh A. *et al.* - Cloning and expression of a prokaryotic enzyme, arginine deiminase, from a primitive eukaryote *Giardia intestinalis*. **Journal of Biological Chemistry**. . ISSN 00219258. 273:8 (1998) 4470–4477. doi: 10.1074/jbc.273.8.4470.
- KOEHLER, Anson V. *et al.* - *Giardia*/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**. . ISSN 07349750. 32:2 (2014) 280–289. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.009.
- KONCZAK, Izabela *et al.* - Antioxidant capacity and hydrophilic phytochemicals in commercially grown native Australian fruits. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 123:4 (2010) 1048–1054. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.060.

- KRÜGER, Timothy; ENGSTLER, Markus - Flagellar motility in eukaryotic human parasites. **Seminars in Cell and Developmental Biology**. . ISSN 10963634. 46:2015) 113–127. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.034.
- KULAKOVA, Liudmila et al. - Discovery of novel anti-giardiasis drug candidates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 10986596. 58:12 (2014) 7303–7311. doi: 10.1128/AAC.03834-14.
- LALLE, Marco et al. - The FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Giardia duodenalis*: an unconventional enzyme that interacts with the gl4-3-3 and it is a target of the antitumoral compound NDBHEX. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664-302X. 6:June (2015) 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2015.00544.
- LEITSCH, David et al. - Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: A central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biology**. . ISSN 15449173. 5:8 (2007) 1820–1834. doi: 10.1371/journal.pbio.0050211.
- LEITSCH, David et al. - Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. . ISSN 22113207. 2:2012) 166–170. doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.04.002.
- LEITSCH, David - Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. **Current Tropical Medicine Reports**. . ISSN 2196-3045. 2:3 (2015) 128–135. doi: 10.1007/s40475-015-0051-1.
- LI, Lei; WANG, Ching C. - A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Molecular Microbiology**. . ISSN 0950382X. 59:1 (2006) 202–211. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04896.x.
- LI, Zhimin et al. - Rational design, synthesis and evaluation of first generation inhibitors of the *Giardia lamblia* fructose-1,6-biphosphate aldolase. **Journal of Inorganic Biochemistry**. . ISSN 01620134. 105:4 (2011) 509–517. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.12.012.
- LIJNEN, Henri R.; FREDERIX, Liesbeth; HOEF, Berthe VAN - Fumagillin reduces adipose tissue formation in murine models of nutritionally induced obesity. **Obesity (Silver Spring, Md.)**. . ISSN 1930-7381. 18:12 (2010) 2241–2246. doi: 10.1038/oby.2009.503.
- LLOYD, D. et al. - Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **Journal of Applied Microbiology**. . ISSN 13645072. 95:3 (2003) 576–583. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02008.x.
- LOPEZ-ROMERO, G. et al. - Host defences against *Giardia lamblia*. **Parasite Immunology**. . ISSN 13653024. 37:8 (2015) 394–406. doi: 10.1111/pim.12210.

- M LINDSAY GRAYSON, SUZANNE M CROWE, JAMES S MCCARTHY, JOHN MILLS, JOHAN W MOUTON, S RAGNAR NORRBY, DAVID L PATERSON, Michael A. Pfaller - Kucers' The Use of Antibiotics, Sixth Edition. Em . ISBN 978-0340927670v. 67. p. 922–923.
- MACHADO, Marisa *et al.* - Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. **Natural Product Communications**. . ISSN 1934578X. 5:1 (2010) 137–141.
- MANNA, Dipak *et al.* - A novel galacto-glycerolipid from *Oxalis corniculata* kills *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 00664804. 54:11 (2010) 4825–4832. doi: 10.1128/AAC.00546-10.
- MASTRONICOLA, Daniela *et al.* - Antioxidant defence systems in the protozoan pathogen *Giardia intestinalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. . ISSN 18729428. (2015). doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.12.002.
- MELTZER, Eyal; LACHISH, Tamar; SCHWARTZ, Eli - Treatment of giardiasis after nonresponse to nitroimidazole. **Emerging Infectious Diseases**. . ISSN 10806059. 20:10 (2014) 1742–1744. doi: 10.3201/eid2010.140073.
- MINOTTO, Linda *et al.* - Characterisation and expression of the carbamate kinase gene from *Giardia intestinalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. . ISSN 01666851. 98:1 (1999) 43–51. doi: 10.1016/S0166-6851(98)00141-8.
- MIYAMOTO, Yukiko; ECKMANN, Lars - Drug development against the major diarrhea-causing parasites of the small intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 6:NOV (2015) 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2015.01208.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. - **Medical Microbiology**. 7^a. ed. ISBN 978-0-323-08692-9.
- NABARRO, L. E. B. *et al.* - Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008–2013. **Clinical Microbiology and Infection**. . ISSN 1198743X. 21:8 (2015) 791–796. doi: 10.1016/j.cmi.2015.04.019.
- NASH, Theodore E. - Unraveling how *Giardia* infections cause disease. **Journal of Clinical Investigation**. . ISSN 00219738. 123:6 (2013) 2346–2347. doi: 10.1172/JCI69956.
- NILLIUS, Dorothea; MÜLLER, Joachim; MÜLLER, Norbert - Nitroreductase (GINRI) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 66:5 (2011) 1029–1035. doi: 10.1093/jac/dkr029.
- OLSON, M. E.; CERI, H.; MORCK, D. W. - *Giardia* vaccination. **Parasitology Today**. . ISSN

01694758. 16:5 (2000) 213–217. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01623-3.

PANIKER, CK Jayaram - **Paniker’s Textbook of Medical Parasitology**. 7^a. ed. Calcutte : Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 2013. ISBN 978-93-5090-534-0.

RAYAN, P. *et al.* - *Terminalia ferdinandiana* extracts as inhibitors of *Giardia duodenalis* proliferation: a new treatment for giardiasis. **Parasitology Research**. . ISSN 14321955. 2015) 2611–2620. doi: 10.1007/s00436-015-4465-4.

REY, Luís - **Bases da parasitologia médica**. 2^a. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan : [s.n.]. ISBN 8527706938.

REYES-VIVAS, Horacio *et al.* - Giardial triosephosphate isomerase as possible target of the cytotoxic effect of omeprazole in *Giardia lamblia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 10986596. 58:12 (2014) 7072–7082. doi: 10.1128/AAC.02900-14.

SOLAYMANI-MOHAMMADI, Shahram *et al.* - A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. . ISSN 1935-2735. 4:5 (2010). doi: 10.1371/journal.pntd.0000682.

TEJMAN-YARDEN, Noa *et al.* - **A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia***. ISBN 8585343338.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH - Giardiasis. **The Center for Food Security & Public Health**. December (2012) 1–13.

VELÁZQUEZ-OLVERA, Stephanía; SALGADO-ZAMORA, Héctor; JIMÉNEZ-CARDOSO, Enequina - Acta Tropica In vitro anti- *Giardia lamblia* activity of 2-aryl-3-hydroxymethyl imidazo [1 , 2-a] pyridines and -pyrimidines , individually and in combination with albendazole. **Acta Tropica**. 155:2016) 6–10.

WOLFE, M. S. - Giardiasis. **Clinical microbiology reviews**. . ISSN 0893-8512. 5:1 (1992) 93–100. doi: 10.1128/CMR.5.1.93.

WU-YUAN, C. D.; CHEN, C. Y.; WU, R. T. - Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. **J Dent Res**. . ISSN 0022-0345. 67:1 (1988) 51–55. doi: 10.1177/00220345880670011001.

YAOYU, Feng; XIAO, Lihua - Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**. . ISSN 08938512. 24:1 (2011) 110–140. doi: 10.1128/CMR.00033-10.

ZHANG, Yan Hong *et al.* - 3,5-Dicaffeoylquinic acid isolated from *Artemisia argyi* and its ester derivatives exert anti-Leucyl-tRNA synthetase of *Giardia lamblia* (GILeuRS) and potential

“Desenvolvimento de fármacos contra *Giardia duodenalis*
Potenciais alvos terapêuticos em protozoários flagelados”

anti-giardial effects. **Fitoterapia**. . ISSN 0367326X. 83:7 (2012) 1281–1285. doi:
10.1016/j.fitote.2012.05.016.