

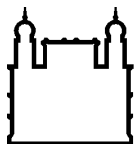
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Biologia Parasitária

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE *GIARDIA DUODENALIS* AO METRONIDAZOL NAS  
SEQUÊNCIAS GÊNICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO FÁRMACO**

**LUIZ ANTONIO PIMENTEL LOPES DE OLIVEIRA**

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***Luiz Antonio Pimentel Lopes de Oliveira***

Efeito da exposição de *Giardia duodenalis* ao metronidazol nas sequências gênicas associadas à resistência ao fármaco.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientadora:** Prof. Dra. Alda Maria Da-Cruz

**RIO DE JANEIRO**  
Dezembro de 2017

Oliveira, Luiz Antonio .

EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE GIARDIA DUODENALIS AO METRONIDAZOL NAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO FÁRMACO / Luiz Antonio Oliveira. - Rio de Janeiro, 2017. xvi,58 f.; il.

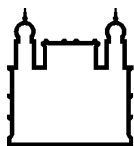
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Alda Maria Da-Cruz.

Bibliografia: f. 49-58

1. Giardíase. 2. Resistência. 3. Metronidazol. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: LUIZ ANTONIO PIMENTEL LOPES DE OLIVEIRA**

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE *GIARDIA DUODENALIS* AO METRONIDAZOL NAS  
SEQUÊNCIAS GÊNICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO FÁRMACO**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Alda Maria Da-Cruz**

**Aprovada em: 19/12/2017**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Márcio Lourenço Rodrigues (FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Victor do Valle Midlej (UFRJ)**

**Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello (UERJ)**

**Prof. Dr. Maria Regina Reis Amendoeira (FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2017



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação mestrado em Biologia Parasitária de **Luiz Antonio Pimentel Lopes de Oliveira**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz. Ao décimo nono dia do mês de dezembro de dois mil e dezessete, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da dissertação mestrado intitulada: **“EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE GIARDIA DUODENALIS AO METRONIDAZOL NAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO FÁRMACO”**

No programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Márcio Lourenço Rodrigues - CDTS/FIOCRUZ, Dr. Victor do Valle Pereira Midlej - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Reis Amendoeira – IOC/FIOCRUZ e Dr. Alexandre Ribeiro Bello – UERJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2017.

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Presidente da Banca):

Dr. Márcio Lourenço Rodrigues (Membro da Banca):

Dr. Victor do Valle Pereira Midlej (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

**Aos meus pais, Joselena e Laroni, e  
ao meu irmão, Guilherme.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Joselena Maria e Laroni Mathias, ao meu irmão, Guilherme José, e minha avó, Ena César, por todo amor que recebi de vocês durante a vida, pelas alegrias e apoio nos momentos de maior dificuldade. A concretização desse sonho não seria possível sem vocês, eu os amo imensamente. A minha antiga babá e segunda mãe, Maria Margarida, e sua filha e minha irmã de coração, Ana Amélia.

Agradeço aos meus grandes amigos: Dijanah Cota, Reinaldo Batista, Yacira Alencar, Anne Michelle, Morgana Vital, Paulo Bonifácio, Rosineide Peixoto, Jarlan Carvalho e Taciana Gomes.

A todos os meus professores da Universidade Federal de Alagoas, em especial a minha professora de parasitologia Dra. Lúcia de Fátima. A todos os membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI) / UFAL.

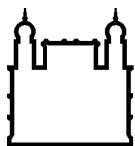
Agradeço a minha orientadora Dra. Alda Maria Da-Cruz por todo apoio recebido durante o mestrado. Agradeço a todos os membros do grupo das parasitoses intestinais (Phelipe Austríaco, Tiara Cascais e Hermínio Cossa), especialmente a minha co-orientadora Dra. Maria Fantinatti, por toda ajuda e paciência, sem o seu apoio a realização desse trabalho não seria possível.

Agradeço a todos os demais membros do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED), em especial Clébio, Rosa, Samyra, Luciana, Raquel, Tainah, Flávia, Andressa, Guilherme, Luzinei, Andreia, Adriano, Eduardo, Tayany, Joanna, Patrícia, Izabel, Milla, Cíntia, Lohaine, Luana e Talita. Agradeço a receptividade, simpatia e ajuda de todos vocês.

Agradeço ao CNPq e aos membros da Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

**“A mais bela coisa que podemos vivenciar é o mistério. Ele é a fonte de qualquer arte verdadeira e qualquer ciência. Aquele que desconhece essa emoção, aquele que não para mais para pensar e não se fascina, está como morto: seus olhos estão fechados”**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

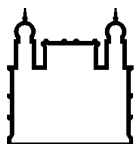
### EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE *GIARDIA DUODENALIS* AO METRONIDAZOL NAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA AO FÁRMACO

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Luiz Antônio Pimentel Lopes de Oliveira

A giardíase é uma doença infecciosa, que tem uma incidência estimada em 280 milhões de casos, acometendo principalmente países em desenvolvimento. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da infecção por *Giardia duodenalis* pertencem à classe dos 5-nitroimidazóis, principalmente o metronidazol. De forma alarmante, casos de falha terapêutica após o tratamento com essa classe de fármacos têm sido cada vez mais frequentes. Embora fatores como utilização inadequada do fármaco, reinfecções e imunossupressão possam estar envolvidos, o surgimento de resistência de *G. duodenalis* é uma hipótese que deve ser investigada, principalmente, já que há um uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos pela população. As proteínas piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR) e ferredoxina (FD) participam da principal via de metabolização do metronidazol a sua forma biologicamente ativa. Além disso, enzimas como a glutamato desidrogenase (GDH) têm sido indiretamente vinculadas à resistência de *G. duodenalis* ao metronidazol. Portanto, alterações nos genes que codificam essas proteínas podem tornar o parasito resistente ao fármaco. O objetivo do estudo foi avaliar se a exposição *in vitro* de *G. duodenalis* ao metronidazol leva a alterações nucleotídicas em fragmentos gênicos associados à redução da susceptibilidade ao fármaco. Para tal, cultivos de trofozoítos de *G. duodenalis* (WBATCC50803) foram divididos em 6 grupos: 4 grupos expostos ao metronidazol nas concentrações de 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M e 80 $\mu$ M denominados MTZ5, MTZ10, MTZ20 e MTZ80, respectivamente; e 2 controles, um sem exposição ao metronidazol (SMTZ) e outro exposto ao dimetilsulfóxido (CDMSO), e cultivados num período de 16 semanas. Posteriormente, a concentração necessária para inibir 50% do crescimento parasitário (IC<sub>50</sub>) foi determinada utilizando o método colorimétrico da resazurina. A padronização da reação em cadeia da polimerase e o sequenciamento de fragmentos gênicos (*pfor*, *fd* e *gdh*), que potencialmente poderiam estar associados à resistência, foram realizados em todos os grupos. O valor da IC<sub>50</sub> dos grupos foi: SMTZ = 2,26  $\pm$  0,3  $\mu$ M; CDMSO = 2,02  $\pm$  0,3  $\mu$ M; MTZ5 = 4,3  $\pm$  0,6  $\mu$ M; MTZ10 = 5,07  $\pm$  0,7  $\mu$ M; MTZ20 = 7,09  $\pm$  0,8  $\mu$ M; não foi possível determinar a IC<sub>50</sub> do grupo MTZ80. Os grupos expostos ao metronidazol apresentaram um aumento significativo da IC<sub>50</sub> em comparação aos controles. Entretanto, não foram encontradas as alterações nucleotídicas nos genes de *pfor*, *fd* e *gdh*, que classicamente vêm sendo associadas à resistência ao metronidazol. Esses resultados indicam que outros mecanismos genéticos ou bioquímicos devem também estar envolvidos na resistência de *G. duodenalis* aos 5-nitroimidazóis.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EFFECT OF *GIARDIA DUODENALIS* EXPOSURE TO METRONIDAZOLE IN GENE SEQUENCES ASSOCIATED WITH DRUG RESISTENCE

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Luiz Antonio Pimentel Lopes de oliveira

Giardiasis is an infectious disease, which has an estimated incidence of 280 million, affecting mainly developing countries. The first choice drugs for treatment of *Giardia duodenalis* infection belong to the class of 5-nitroimidazoles, mainly metronidazole. Alarmingly, cases of treatment failure following treatment with this drugs class have been increasingly frequent. Although factors such as inadequate use of the drug, reinfections and immunosuppression may be involved, the emergence of *G. duodenalis* resistance is a hypothesis that should be investigated, mainly due to the indiscriminate use of antimicrobial drugs by the population. The pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) and ferredoxin (FD) proteins participate in the main route of metronidazole metabolism to its biologically active form. In addition, enzymes such as glutamate dehydrogenase (GDH) have been indirectly linked to resistance of *G. duodenalis* to metronidazole. Therefore, changes in the genes encoding these proteins may cause resistance in the parasite. The aim of the study was to evaluate if the *in vitro* exposure of *G. duodenalis* to metronidazole leads to nucleotide changes in gene fragments associated with reduced susceptibility to the drug. For this, *G. duodenalis* trophozoites (WBATCC50803) were cultured in six groups: four groups exposed to metronidazole, named MTZ5, MTZ10, MTZ20 and MTZ80, at concentrations of 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M and 80  $\mu$ M of the drug, respectively; and two controls, called SMTZ (without exposure to metronidazole) and CDMSO (exposed to dimethylsulfoxide), and cultured over a 16 week period. Subsequently, the concentration required to inhibit 50% parasitic growth was determined using the colorimetric method of resazurin. Standardization of the polymerase chain reaction and the sequencing of gene fragments (*pfor*, *fd* and *gdh*) that could potentially be associated with resistance were performed in all groups. The IC<sub>50</sub> value of the groups was: SMTZ = 2.26  $\pm$  0.3  $\mu$ M; CDMSO = 2.02  $\pm$  0.3  $\mu$ M; MTZ5 = 4.3  $\pm$  0.6  $\mu$ M; MTZ 10 = 5.07  $\pm$  0.7  $\mu$ M; MTZ20 = 7.09  $\pm$  0.8  $\mu$ M; it was not possible to determine the IC<sub>50</sub> of the MTZ80 group. Groups exposed to metronidazole showed a significant increase in IC<sub>50</sub> compared to controls. However, although we observed a decrease in drug susceptibility, no nucleotide changes were found in the *pfor*, *fd* and *gdh* genes that have been associated with resistance to metronidazole. These results indicate that other genetic or biochemical mechanisms may be involved in the resistance of *G. duodenalis* to 5-nitroimidazoles.

## ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologia.....	1
1.2 Histórico.....	2
1.3 Gênero <i>Giardia</i> .....	3
1.4 Biologia celular de <i>Giardia duodenalis</i> .....	5
1.5 Genótipos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	7
1.6 Ciclo biológico de <i>Giardia</i> .....	7
1.7 Giardíase .....	8
1.8 Diagnóstico .....	9
1.9 Tratamento .....	11
1.10 Metronidazol .....	17
1.11 Resistência parasitária ao metronidazol .....	19
1.12 Justificativa.....	21
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1 Cultivo axênico de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	24
3.2 Exposição do cultivo de <i>Giardia duodenalis</i> ao metronidazol e determinação da concentração necessária para inibir 50% do crescimento parasitário (IC <sub>50</sub> ).....	24
3.3 Extração de DNA de cultivo axênico de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i> .....	25
3.4 Padronização da reação em cadeia da polimerase para amplificação dos genes <i>pfor</i> , <i>fd</i> e <i>gdh</i> de <i>Giardia duodenalis</i> .....	26
3.5 Purificação, sequenciamento e análise das sequências dos fragmentos gênicos de <i>pfor</i> , <i>fd</i> e <i>gdh</i> .....	27
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>29</b>

4.1	Efeito da exposição ao metronidazol na susceptibilidade de <i>Giardia duodenalis</i> em cultivo axênicos. ....	29
4.2	Amplificação de fragmentos gênicos de região conservada <i>gdh</i> e associados à resistência <i>pfor</i> e <i>fd</i> de <i>Giardia duodenalis</i> em cultivo axênico.....	31
4.3	Sequenciamento de fragmento conservado da glutamato desidrogenase ( <i>gdh</i> ) e dos genes associados à resistência piruvato-ferredoxina oxidorreductase ( <i>pfor</i> ) e ferredoxina ( <i>fd</i> ) em cepa axênica de <i>Giardia duodenalis</i> expostas e não-expostas ao metronidazol. ....	34
5	<b>DISCUSSÃO</b>	38
6	<b>CONCLUSÕES</b>	47
7	<b>PERSPECTIVAS</b>	48
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descarboxilação oxidativa do piruvato pelo sistema piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR)/ferredoxina (FD) em <i>Giardia duodenalis</i> .....	4
Figura 2. Trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> em corte transversal.....	5
Figura 3. Trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> em corte longitudinal.....	6
Figura 4. Cisto de <i>Giardia duodenalis</i> .....	6
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i> .....	8
Figura 6. Estrutura molecular da quinacrina.....	12
Figura 7. Estrutura molecular da furazolidona.....	13
Figura 8. Estrutura molecular da paromomicina.....	14
Figura 9. Estrutura molecular da nitazoxanida.....	15
Figura 10. Estrutura molecular do albendazol.....	16
Figura 11. Metabolização dos 5-nitroimidazóis.....	17
Figura 12. Estrutura molecular da azomicina.....	18
Figura 13. Estrutura molecular do metronidazol.....	18
Figura 14. Concentração de metronidazol necessária para inibir 50% do crescimento parasitário em cepas WB de <i>Giardia duodenalis</i> .....	30
Figura 15. Amplificação de fragmento gênico conservado <i>gdh</i> de <i>Giardia duodenalis</i> .....	31
Figura 16. Amplificação de fragmento gênico associado à resistência <i>pfor</i> de <i>Giardia duodenalis</i> .....	32
Figura 17. Amplificação de fragmento gênico associado à resistência <i>fd</i> de <i>Giardia duodenalis</i> .....	33
Figura 18. Sequenciamento de fragmento gênico conservado da glutamato desidrogenase ( <i>gdh</i> ) de <i>Giardia duodenalis</i> expostas e não-expostas ao metronidazol.....	35
Figura 19. Sequenciamento de fragmento gênico da piruvato-ferredoxina oxidorreductase ( <i>pfor</i> ) de <i>Giardia duodenalis</i> expostas e não-expostas ao metronidazol.....	36
Figura 20. Sequenciamento de fragmento gênico da ferredoxina ( <i>fd</i> ) de <i>Giardia duodenalis</i> expostas e não-expostas ao metronidazol.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos pares de <i>primers</i> e concentração final dos reagentes após padronização da reação em cadeia da polimerase para os genes <i>pfor</i> , <i>fd</i> e <i>gdh</i> .....	27
Tabela 2. Condições de amplificação para cada reação em cadeia da polimerase para os genes <i>pfor</i> , <i>fd</i> e <i>gdh</i> .....	27
Tabela 3. Comparação entre os valores da IC <sub>50</sub> entre diferentes cepas de <i>Giardia duodenalis</i> expostas e não-expostas ao metronidazol .....	40

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura química das classes de fármacos utilizados no tratamento da giardíase .....	11
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenina
<i>β-gia</i>	β-giardina (gene)
CWP	Proteína da parede cística (do inglês “Cist Wall Protein”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
EPF	Exame parasitológico de fezes
EUA	Estados Unidos da América
<i>fd</i>	Ferredoxina (gene)
FD	Ferreroxina (proteína)
<i>Gdh</i>	Glutamato desidrogenase (gene)
GDH	Glutamato desidrogenase (proteína)
mRNA	RNA mensageiro
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotidamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDH	Piruvato desidrogenase
<i>pfor</i>	Piruvato-ferredoxina oxidorredutase (gene)
PFOR	Piruvato-ferredoxina oxidorredutase (proteína)
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>tpi</i>	Triose fosfato isomerase (gene)



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia

A giardíase é uma doença infectoparasitária causada pelo protozoário *Giardia duodenalis* (também denominado *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis*). Essa infecção apresenta distribuição mundial e o parasito pode habitar o intestino delgado (duodeno e jejuno) de mais de 40 espécies de animais, sendo essa doença considerada uma zoonose (Marshall et al. 1997).

Em países desenvolvidos, estima-se que a prevalência da giardíase seja de 2-5% na população, enquanto que nos países em desenvolvimento, a prevalência estimada da doença é de 20-30% (Marshall et al. 1997). A última estimativa mundial aponta a ocorrência de 280 milhões de novas infecções por *G. duodenalis* a cada ano (Lane & Lloyd 2002; Lalle 2010).

No Brasil, a giardíase é encontrada em todas as regiões. Entretanto, não existe um inquérito nacional que apresente as reais prevalências da infecção no país. Os dados disponíveis são frutos de estudos individuais e seccionais predominantemente na região sudeste, onde as prevalências podem alcançar cifras de 78,3% e 69,6%, como relatados em estudos realizados em Minas Gerais e São Paulo, respectivamente. Nas demais regiões, prevalências maiores que 30% também foram encontradas nos estados do Maranhão, Amapá, Sergipe e Paraná (Coelho et al. 2017).

No estado do Rio de Janeiro, estudo realizado pelo Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, analisando fezes de 3.245 indivíduos durante o período de 2012-2015, encontrou uma prevalência de 8,1% da infecção por *G. duodenalis* (Faria et al. 2017a). Em um estudo na cidade do Rio de Janeiro, a prevalência da giardíase em crianças alcançou 27,7%, enquanto que em adultos apenas 1,7% das amostras clínicas de fezes analisadas foram positivas para *G. duodenalis* (Volotão et al. 2007). Porém, estudos em regiões favelizadas da cidade do Rio de Janeiro demonstram uma prevalência em pré-escolares de 49,4% (Fantinatti et al. 2016).

A transmissão da giardíase ocorre por via fecal-oral, principalmente pela ingestão de cistos presentes em água contaminada. Há também a possibilidade de transmissão por alimentos contaminados ou diretamente de pessoa a pessoa

(Ortega & Adam 1997). *Giardia* foi responsável por 37% dos surtos veiculados por contaminação hídrica causados por protozoários no período de 2011-2016 no mundo (Efstratiou et al. 2017).

Os grupos de maior risco para adquirir giardíase sintomática são crianças, indivíduos que viajam para áreas onde a doença é endêmica e indivíduos imunossuprimidos (Farthing 1996) As crianças são mais susceptíveis à giardíase, embora a doença seja rara nos primeiros seis meses de vida devido à amamentação, e a transferência de imunoglobulinas deve contribuir para esse efeito benéfico (Tellez et al. 2003).

*Giardia* é um dos principais agentes etiológicos, com exceção de alguns vírus e bactérias, responsável por doenças diarreicas em humanos (Lalle 2010). Em crianças na faixa de 0-2 anos, *Giardia* é o protozoário intestinal mais frequente. Em crianças de 12 meses a 24 meses, oriundas de países em desenvolvimento, *Giardia* é o segundo agente etiológico mais frequente em amostras de fezes diarreicas e não diarreicas, ficando atrás apenas de *Campylobacter* spp. Já em crianças de 0-11 meses, *Giardia* é o quarto agente etiológico mais frequente em amostras de fezes diarreicas e não diarreicas, também ficando atrás apenas de *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enteroagregativa e norovírus (Platts-Mills et al. 2015). A prevalência tende a aumentar durante a infância e declina durante a adolescência (Farthing 1996).

A transmissão direta é comum entre crianças que frequentam creches, escolas e em outras instituições onde se convive de forma aglomerada, como orfanatos, asilos e clínicas psiquiátricas. Geralmente, nessas circunstâncias, a infecção é resultante de falhas nos procedimentos de higiene pessoal, com disseminação dos parasitos entre pessoas da instituição. Homossexuais do sexo masculino também apresentam maior prevalência de giardíase (Farthing 1996).

Tendo em vista a importância e forte conexão com situações de pobreza, *Giardia* e *Cryptosporidium* foram incluídos, em setembro de 2004, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), entre as doenças consideradas negligenciadas (Savioli et al. 2006).

## 1.2 Histórico

A primeira observação de *G. duodenalis* data de 1681 quando Anton Van Leeuwenhoek, usando lentes caseiras, conseguiu visualizar o parasito em suas

próprias fezes (Dobell 1920). Uma descrição mais detalhada do parasito foi realizada por Lambl, em 1859, que o classificou dentro do gênero *Cercomonas* e denominou a espécie de *Cercomonas intestinalis* (Lambl 1859).

A primeira descrição do cisto de *Giardia* ocorreu em 1879, por Grassi, que identificou os cistos nas fezes de roedores, porém, acreditou que eram estruturas provenientes de coccídios (Meyer & Jarrol 1980).

A nomenclatura de *Giardia* foi utilizada primeiramente por Kunstler em 1882, que descreveu um organismo encontrado em anfíbio (provavelmente *Giardia agilis*); e seis anos após, Blanchard sugeriu o nome *Lambliia intestinalis*. Finalmente, em 1902, Stiles alterou o nome do parasito para *G. duodenalis*. Porém, Kofoid e Christiansen propuseram o nome *G. lamblia* em 1915 e *Giardia enterica* em 1920, respectivamente. Atualmente, a nomenclatura aceita para a espécie é *G. duodenalis*, *G. lamblia* ou *G. intestinalis* (Monis et al. 2009).

### 1.3 Gênero *Giardia*

O gênero *Giardia* está classificado no reino Protozoa, sub-reino Archezoa, filo Metamonada, subfilo Trichozoa, superclasse Eopharyngia, classe Trepomonadea, subclasse Diplozoa e ordem Giardiida (que inclui as famílias Octomitidae e Giardiidae) (Adam 2001; Thompson & Monis, 2012).

Atualmente, existem seis espécies reconhecidas do gênero *Giardia*: *G. agilis*, que parasita anfíbios; *Giardia ardeae*, que parasita aves; *Giardia psittaci*, que parasita aves; *Giardia muris*, que parasita roedores; *Giardia microti*, que parasita roedores e *G. duodenalis*, que parasita diversos mamíferos (Monis et al. 2009).

Apesar de a maioria dos organismos eucariontes depender de respiração aeróbia, os membros do gênero *Giardia* spp., caracterizados pela falta de uma mitocôndria típica, não apresentam ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Mesmo na presença de oxigênio, *Giardia* obtém energia pela glicólise (Thompson et al. 1993; Adam 2001).

A glicose não é completamente oxidada pelos parasitos do gênero *Giardia*, gerando como produto final acetato, etanol, alanina e dióxido de carbono, ao invés de água e dióxido de carbono como a maioria dos eucariotos aeróbios. Além do uso de carboidratos, *G. duodenalis* pode utilizar alguns aminoácidos para obtenção de ATP, como arginina e aspartato (Adam 2001).

Em eucariotos existem dois sistemas enzimáticos que são utilizados para

catalisar a descarboxilação oxidativa do piruvato em Acetil-CoA: a piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) e a piruvato desidrogenase (PDH). *Giardia* utiliza a enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) para promover essa reação. Os elétrons recebidos por essa enzima durante a reação são transferidos para a proteína ferredoxina que, posteriormente, é reoxidada a sua forma reduzida (Figura 1) (Thompson et al. 1993, Adam 2001).

Estruturalmente, tanto a piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) quanto a ferredoxina (FD) apresentam como cofatores enzimáticos os grupamentos Fe-S, que são importantes nas reações de oxidorredução do parasito (Townson et al. 1994; Charon et al. 1999). Além disso, a piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) depende de uma coenzima, a tiamina pirofosfato para o seu funcionamento (Charon et al. 1999).

Em humanos, a conversão do piruvato em Acetil-CoA é realizada no interior da micocôndria pela piruvato desidrogenase. Esta enzima utiliza a nicotinamida adenina diclucleotídeo (NAD), ao invés da ferredoxina, como acceptor de elétrons na descaboxilação oxidativa do piruvato. A reação de descarboxilação oxidativa do piruvato e as reações de oxidorredução que a seguem são importantes para a continuidade do fluxo na via glicolítica e, portanto, na geração de energia para a realização das funções da célula (Thompson et al. 1993).

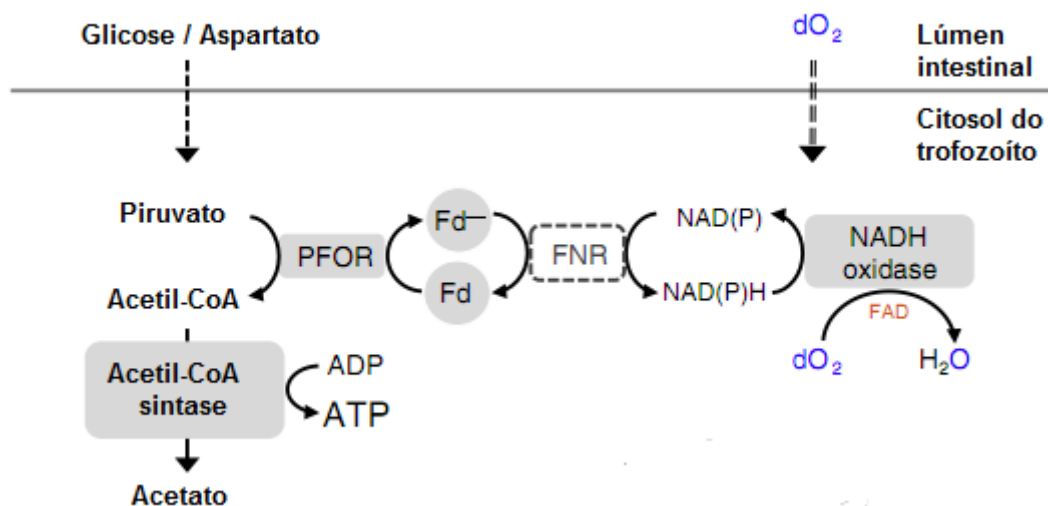


Figura 1. Descarboxilação oxidativa do piruvato pelo sistema piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR)/ferredoxina (FD) em *Giardia duodenalis*. Fonte: adaptado Ansell et al. 2015.

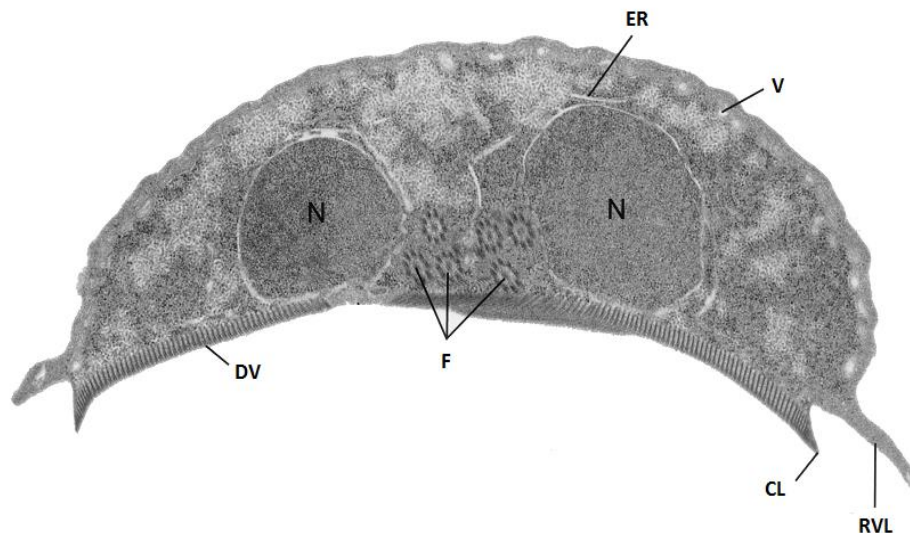
*Giardia* não consegue sintetizar a maioria dos aminoácidos necessários para a construção de suas proteínas, com exceção de alanina e valina, obtendo-os do meio

externo. Notavelmente, dentre os aminoácidos, há necessidade de uma alta concentração de cisteína para o desenvolvimento dos trofozoítos, provavelmente pelo efeito parcial que oferece contra os efeitos tóxicos de altas concentrações de oxigênio. Além disso, os membros do gênero *Giardia* obtêm lipídeos e as bases nitrogenadas, tanto purinas como pirimidinas, do meio externo (Adam 2001).

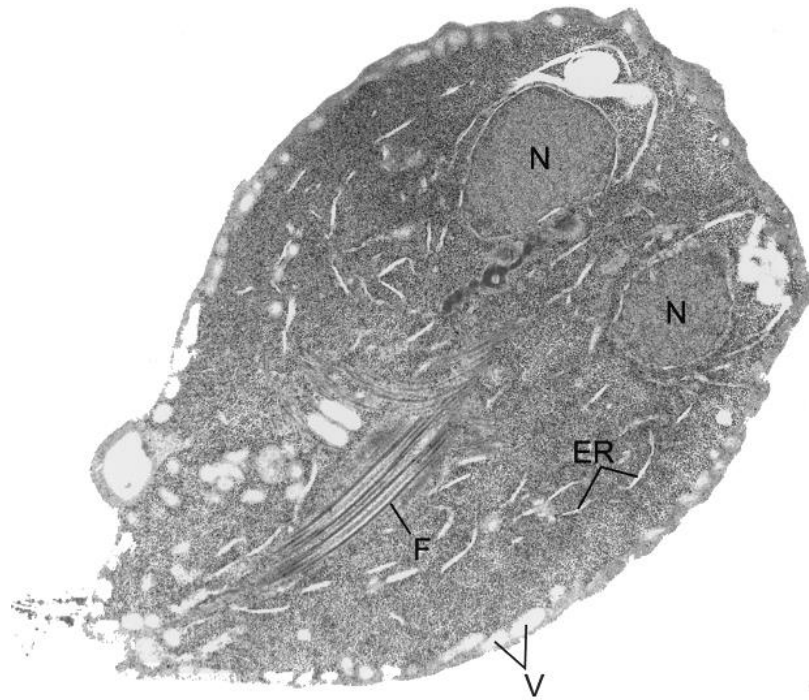
#### 1.4 Biologia celular de *Giardia duodenalis*

*G. duodenalis* apresenta duas formas evolutivas: o cisto e o trofozoíto. O trofozoíto mede de 12-15  $\mu\text{m}$  de comprimento e 5-9  $\mu\text{m}$  de largura, apresenta aspecto piriforme com simetria bilateral, além de uma superfície ventral (côncava) e outra dorsal (convexa) (Ortega & Adam 1997).

Algumas características peculiares do trofozoíto incluem a presença de dois núcleos, a ausência de mitocôndrias, peroxissomos e de um aparato de Golgi típico. Na periferia do parasito, são encontradas as vesículas periféricas, que têm função análoga aos lisossomos. *G. duodenalis* apresenta um disco ventral, 4 pares de flagelos (anterior, ventral, posterolateral e caudal) e corpos medianos, cuja função ainda é desconhecida (Adam 2001) (Figura 2 e Figura 3).



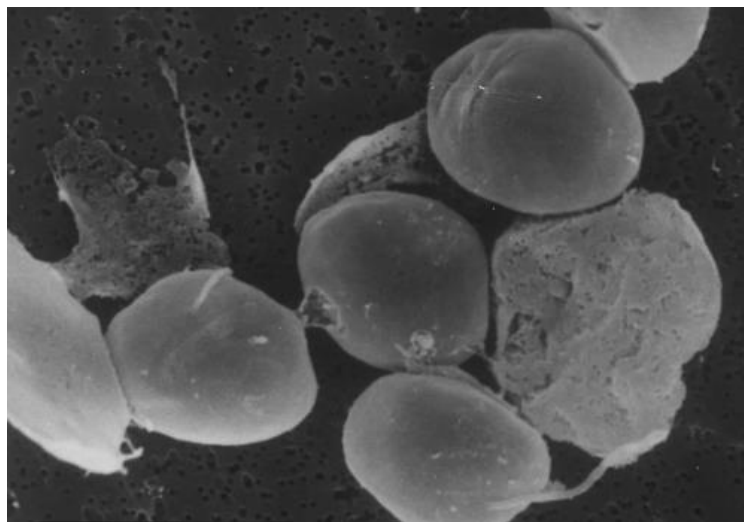
**Figura 2. Trofozoíto de *Giardia duodenalis* em corte transversal.** Visualização de estruturas intracelulares em vista transversal: núcleos (N), retículo endoplasmático (ER), vesícula periférica (V), disco ventral (DV), crista lateral (CL), crista ventrolateral (RVL) e axonema (F). Fonte: Adaptado Adam 2001.



**Figura 3. Trofozoíto de *Giardia duodenalis* em corte longitudinal.** Visualização de estruturas intracelulares em vista longitudinal: núcleos (N), retículo endoplasmático (ER), axonema (F) e vesícula periférica (V). Fonte: adaptado Adam 2001.

Durante o processo de encistamento, o trofozoíto passa por mudanças morfológicas e moleculares, com a indução de genes específicos, como as que codificam as proteínas CWPs (do inglês “Cyst Wall Protein”) e enzimas relacionadas com a síntese de carboidratos presentes na parede do cisto (Mowatt et al. 1995).

O cisto (Figura 4) apresenta uma forma arredondada ou elíptica que mede 8-12  $\mu\text{m}$  de comprimento e 7-10  $\mu\text{m}$  de espessura, possuindo em seu interior 4 núcleos tetraploides, constituindo a forma infectante do parasito (Ortega & Adam 1997).



**Figura 4. Cisto de *Giardia duodenalis*.** Fonte: Ortega & Adam 1997.

## 1.5 Genótipos de *Giardia duodenalis*

A grande heterogeneidade encontrada dentro da espécie *G. duodenalis* fez com que a espécie fosse dividida em 8 genótipos (A-H) (Feng & Xiao 2011).

Os genótipos A e B são, classicamente, associados à infecção em humanos e em outros mamíferos (Faria et al. 2017b). No entanto, estudos recentes de nosso grupo detectaram o genótipo E associado à infecção em humanos (Fantinatti et al. 2016).

Os outros genótipos são considerados hospedeiro-específicos; sendo os genótipos C e D associados à infecção em cães (Monis et al. 1998); o genótipo E foi isolado em animais de pastos (Ey et al. 1996); o genótipo F é específico para gatos (Mayrhofer et al. 1995); o genótipo G é específico para roedores (Monis et al. 1999) e o genótipo H foi descrito em fezes de focas (Lasek-Nesselquist et al. 2010).

Diversos genes têm sido utilizados para a genotipagem de *G. duodenalis*, sendo os mais comuns os que codificam para a glutamato desidrogenase (*gdh*), triose fosfato isomerase (*tpi*) e  $\beta$ -giardina ( $\beta$ -*gia*) (Feng & Xiao 2011, Faria et al. 2017b).

## 1.6 Ciclo biológico de *Giardia* spp

O ciclo biológico de *G. duodenalis* é simples e do tipo monoxênico, envolvendo as etapas de encistamento e desencistamento do parasito no hospedeiro (Figura 5).

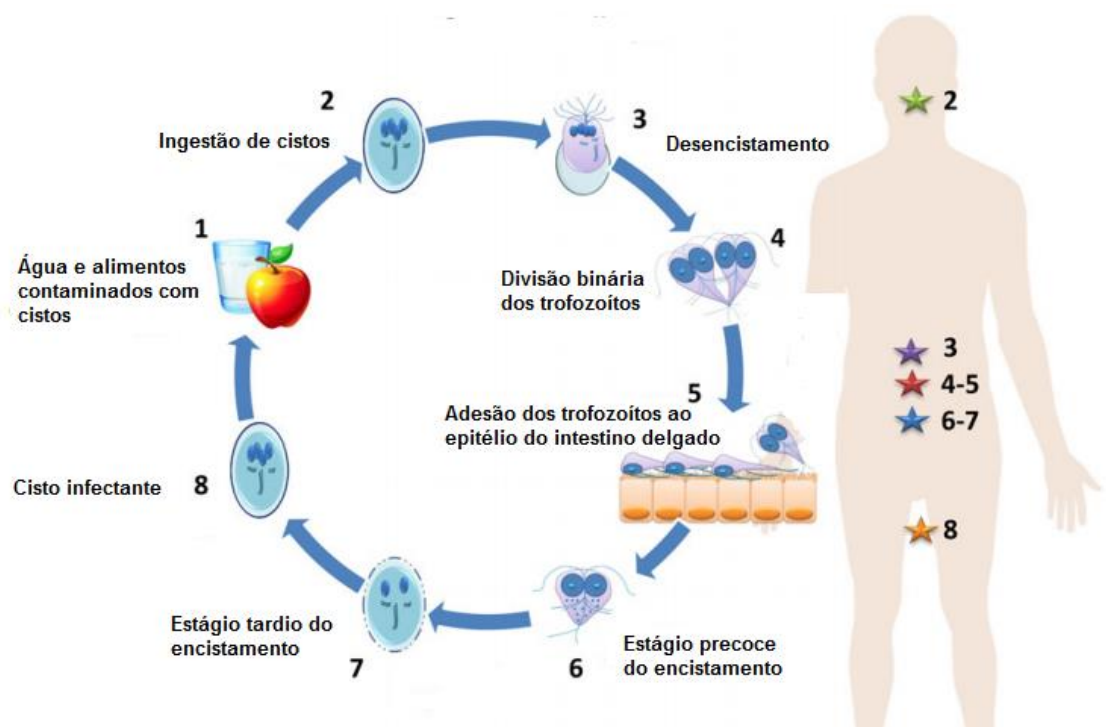
A quantidade de cistos necessária para se adquirir a infecção é baixa, e estima-se que a ingestão de 10-100 cistos já é suficiente para o estabelecimento do parasito no hospedeiro (Rendtorff 1954). Em condições adequadas de umidade e temperatura, como em água fria (4-10°C), o cisto pode permanecer viável no ambiente por vários meses (Wolfe 1992).

Os cistos são relativamente resistentes ao processo de cloração e desinfecção por radiação ultravioleta. No entanto, são bastante sensíveis à temperatura elevada obtida durante a fervura e podem ser removidos por filtração com eficácia, desde que utilizados filtros com tamanho do poro menor que 2  $\mu$ m (Ortega & Adam 1997).

A infecção se inicia a partir da ingestão de cistos, que após o contato do com o pH ácido do conteúdo estomacal, dá início ao processo de modificação do parasito

(desencistamento), que se transforma na forma trofozoítica no intestino delgado do hospedeir e se divide por fissão binária. O trofozoíto se adere ao epitélio intestinal, principalmente nas criptas, por meio do disco ventral, obtendo recursos nutricionais para sua multiplicação do meio externo (Eckmann 2003).

O trofozoíto inicia seu processo de encistamento quando migra para as porções mais distais do intestino delgado, onde alguns estímulos presentes nessa região que incluem alterações na concentração de bile, pH básico e baixa concentração de colesterol engatilham o processo de encistamento. O cisto perde a capacidade de se aderir à mucosa intestinal e é liberado pelas fezes, podendo infectar novos hospedeiros (Eckmann 2003).



**Figura 5. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*.** 1-2) Ingestão de cisto em água e alimentos contaminados; 3) exposição ao pH ácido do estômago promove o processo de desencistamento; 4) um cisto origina dois trofozoítos, que se dividem por fissão binária; 5) parasitos se multiplam e aderem ao epitélio do intestino delgado; 6-7) durante a passagem pela porção mais distal do intestino delgado, o trofozoíto entra em processo de encistamento; 8) cisto infectante é liberado nas fezes do hospedeiro, promovendo a contaminação ambiental. Fonte: adaptado Eckmann 2003.

## 1.7 Giardíase

A infecção por *G. duodenalis* pode se apresentar de forma assintomática, aguda ou crônica. Após a ingestão de cistos de *G. duodenalis*, o período de incubação da doença é cerca de uma a duas semanas (Hill & Nash 2015).

A giardíase sintomática tem início agudo; embora diarreia, flatulência, inchaço e cólicas abdominais sejam os sintomas mais evidentes, também podem ocorrer



náuseas, mal-estar, urticária e perda de peso; vômito, febre e tenesmo também ocorrem ainda que menos frequentente (Hill 1993). A diarreia, no início da doença, pode se apresentar de forma profusa e aquosa. No entanto, as fezes são predominantemente esteatorreicas e de odor fétido, e podem chegar a uma média de nove evacuações por dia (Cantey et al. 2011). O curso da infecção aguda costuma ser benigno, porém, em alguns casos, como em crianças menores de cinco anos e em mulheres grávidas, a doença pode ser mais grave, com perda abundante de líquido, quadro em que pode ser necessária a hospitalização (Lengerich et al. 1994). A presença de sangue, muco, pus e polimorfonucleares nas fezes não é característica da giardíase, sendo mais sugestiva de outras patologias como, por exemplo, a amebíase (Hill & Nash 2015).

Dentre as consequências a longo prazo da giardíase, destaca-se a associação com a síndrome do intestino irritável. A giardíase está sendo implicada na etiologia de alguns distúrbios extraintestinais, como patologias oculares, artrite reativa, síndrome da fadiga crônica, alergias e alterações musculares. A giardíase também está associada, principalmente em crianças, a deficiências nutricionais, que podem levar à falha no crescimento pômdero-estatural e prejuízos na cognição (Halliez & Buret 2013).

## 1.8 Diagnóstico

Um diagnóstico presuntivo da giardíase deve ser considerado em pacientes com diarreia prolongada, principalmente naqueles em que há associação com perda de peso e má absorção. Quando estão associados a esses sintomas fatores de risco, como crianças que frequentam creches e indivíduos que viajaram para áreas endêmicas, eleva-se a possibilidade de que o paciente esteja com giardíase. No entanto, deve ser considerado o diagnóstico de outros patógenos entéricos como criptosporidiose, ciclosporíase, doenças de etiologia viral e bactérias que não invadem o epitélio intestinal (Hill & Nash 2015).

O diagnóstico da giardíase é realizado preponderantemente pelo exame parasitológico de fezes (EPF). Em casos de diarreia, uma preparação de fezes com solução salina em lâmina de microscopia permite a visualização das formas trofozoíticas. No entanto, o trofozoíto de *G. duodenalis* morre rapidamente após a sua liberação nas fezes, limitando essa forma de diagnóstico. Em fezes pastosas e formadas, a forma visualizada é o cisto. Há diversos métodos para visualização dos

cistos, sendo a sedimentação espontânea a mais simples e barata, mas os métodos mais específicos utilizam as técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e centrífugo-sedimentação (McHardy et al. 2014). Os cistos e trofozoítos de *G. duodenalis* também podem ser identificados em esfregaços com coloração permanente, sendo as colorações mais utilizadas a do tricrômico e a da hematoxilina férrica, que revelam estruturas intracelulares importantes para identificação do parasito (Roberts & Zeibig 2014).

Os cistos de *G. duodenalis* são eliminados de forma intermitente, o que afeta a sensibilidade do EPF. A análise de uma única amostra apresenta uma sensibilidade que varia de 60-80%, valor que é elevado a cerca de 90% com a coleta de três amostras fecais; sendo a sensibilidade do EPF, juntamente com a necessidade de um microscopista bem treinado, uma limitação do EPF (Hiatt et al. 1995).

Para contornar os problemas relacionados ao EPF, métodos como os ensaios imunoenzimáticos para detecção de antígenos e de imunofluorescência para detecção de *Giardia* estão comercialmente disponíveis. Esses são reprodutíveis, não exigem um microscopista treinado e são realizados com maior rapidez (Garcia & Shimizu 1997). Contudo, seu alto custo ainda inviabiliza seu uso na rotina.

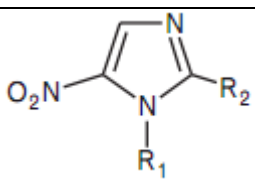
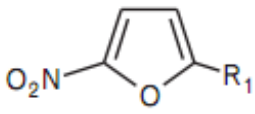
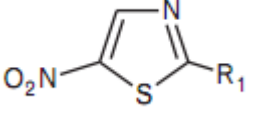
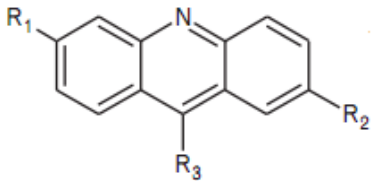
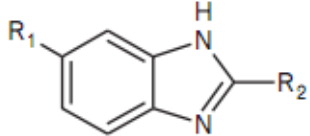
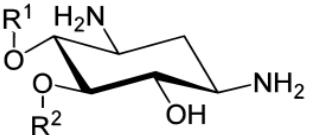
O diagnóstico por reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente sensível, podendo detectar a presença de até um cisto na amostra fecal. Amplificando o DNA, a PCR ainda possibilita a genotipagem de *G. duodenalis* (Feng & Xiao 2011). Todavia, essas metodologias vêm sendo utilizadas majoritariamente para fins de pesquisa.

Nos casos em que o paciente apresenta diarreia crônica e má absorção, com forte suspeita clínica de giardíase, associados ao EPF constantemente negativo, pode-se realizar, embora com frequência baixa, o exame direto do conteúdo do intestino delgado, o teste do barbante e até mesmo um teste mais invasivo, como a realização de biópsia para análise de fragmento de tecido, que pode detectar a presença também de outras patologias. Os exames sorológicos não conseguem diferenciar entre infecção aguda ou exposição ao parasito no passado, logo são utilizados para pesquisas em nível epidemiológico (Ortega & Adam 1997).

## 1.9 Tratamento

Atualmente, existem seis classes de fármacos utilizados para o tratamento da giardíase: derivados de acridina, 5-nitroimidazóis, 5-nitrofuranos, 5-nitrotiazóis, aminoglicosídeos e benzimidazóis (Escobedo et al. 2010, Lalle 2010, Tejman-Yarden & Eckmann 2011) (Quadro 1).

**Quadro 1. Estrutura química das classes de fármacos utilizados no tratamento da giardíase**

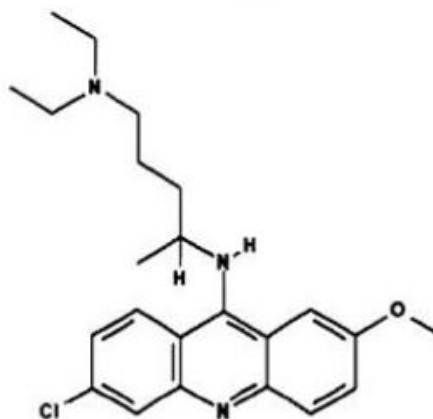
Classe do fármaco	Estrutura química	Exemplos
5-nitroimidazol		Metronidazol Tinidazol Secnidazol Ornidazol
5-nitrofurano		Furazolidona
5-nitrotiazol		Nitazoxanida
Derivados de acridina		Quinacrina
Benzimidazol		Albendazol Mebendazol
Aminoglicosídeos		Gentamicina Canamicina Paromomicina

Fonte: Adaptado Tejman-Yarden & Eckmann 2011.

Todos os fármacos utilizados para o tratamento da giardíase foram extraídos ou sintetizados para a utilização contra outros microrganismos. Todavia, com o decorrer do tempo, a atividade deles frente a *G. duodenalis* foi comprovada e, atualmente, esses fármacos fazem parte do arsenal terapêutico no combate a infecção (Tejman-Yarden & Eckmann 2011).

O derivado da acridina, quinacrina (Figura 6), foi introduzido como agente antimalárico em 1930 e foi bastante utilizado para essa finalidade pelas tropas aliadas durante a segunda guerra mundial; após a guerra, tornou-se um importante fármaco para o tratamento de *G. duodenalis*, com uma eficácia clínica superior a 90% (Gardner & Hill 2001).

O mecanismo de ação da quinacrina não está bem esclarecido, todavia, o fármaco se liga ao DNA de *G. duodenalis* e, portanto, pode inibir a síntese de ácidos nucleicos (Tejman-Yarden & Eckmann 2011).



**Figura 6. Estrutura molecular da quinacrina.** Fonte: Lalle 2010.

Apesar de ser clinicamente bastante efetiva numa dosagem de 100 mg, três vezes ao dia para adultos, e 2mg/Kg, três vezes ao dia para crianças, a quinacrina apresenta efeitos colaterais graves (Wolfe 1992). Este fármaco pode induzir episódios de psicose, dermatite esfoliativa e retinopatia (Farthing 1996). Além disso, pode exacerbar episódios de psoríase e causar hemólise em pacientes com deficiência em glicose 6-fosfato desidrogenase. Também é contraindicada em gestantes, devido à possibilidade de causar espinha bífida e agenesia renal nos fetos (Gardner & Hill 2001).

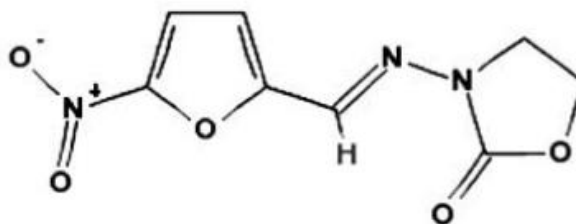
As queixas de vômito, associado ao gosto amargo da quinacrina, têm sido reportados em até 28% dos pacientes que utilizam esse fármaco, o que leva à baixa adesão ao tratamento, principalmente em crianças; ademais, pode levar a coloração alaranjada da pele, urina e esclera, que pode perdurar até quatro meses após o

término do tratamento (Craft et al. 1981).

Apesar dessas desvantagens com relação aos efeitos colaterais, nos casos refratários de giardíase, a quinacrina ou a associação da quinacrina com metronidazol tem sido recomendada para a erradicação do parasito (Nash et al. 2001).

A furazolidona (Figura 7) é um 5-nitrofurano efetivo contra diversas bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*; e sua utilização para o tratamento da giardíase teve início em 1950 (Webster 1960).

Assim como os 5-nitroimidazóis, a furazolidona é considerada um pró-fármaco, pois necessita sofrer metabolização para exercer seus efeitos biológicos. Porém, a metabolização da furazolidona por trofozoítos de *G. duodenalis* utiliza a enzima NADH oxidase para a reação de redução do grupo 5-nitro (NO<sub>2</sub>) da furazolidona (Brown et al. 1996). Após sua ativação, o fármaco causa lesão oxidativa em macromoléculas como DNA e proteínas (Gardner & Hill 2001).



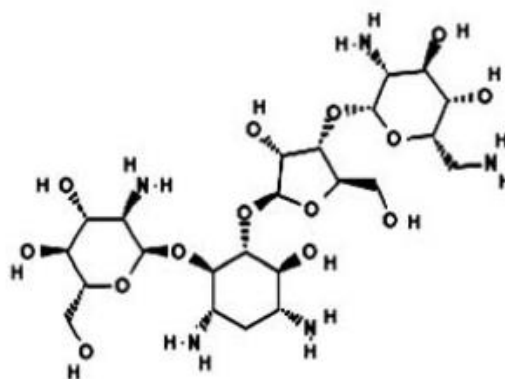
**Figura 7. Estrutura molecular da furazolidona.** Fonte: Lalle 2010.

A eficácia da furazolidona é menor do que a da quinacrina e dos 5-nitroimidazóis. Outra desvantagem do tratamento é a duração prolongada e a posologia: o tratamento tem uma duração de 7-10 dias e a dose recomendada do fármaco é de 100 mg (adultos) / 1,5 mg/Kg (crianças) tomadas 4 vezes ao dia para ambos (Bassily et al. 1970).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náuseas, vômito e diarreia; a furazolidona também confere uma cor amarronzada à urina e pode causar hemólise em pacientes com deficiência em glicose 6-fosfato desidrogenase. Pelo risco de hemólise, crianças com menos de um ano também não devem utilizar essa medicação (Gardner & Hill 2001).

A paromomicina (Figura 8) é um membro dos aminoglicosídeos, antibióticos de amplo espectro, produzido pela bactéria *Streptomyces riomusus* e isolada em

1956 (Davidson et al. 2009). Assim como sua atuação nas bactérias, a paromomicina inibe a síntese proteica em *G. duodenalis* (Katiyar et al. 1995).

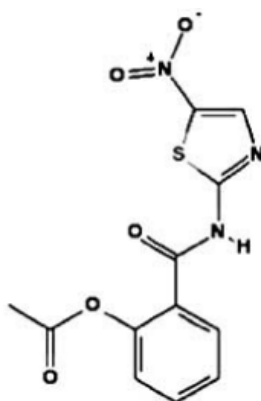


**Figura 8. Estrutura molecular da paromomicina.** Fonte Lalle 2010.

Como outros aminoglicosídeos, se absorvidos sistemicamente, podem causar nefrotoxicidade e ototoxicidade; no entanto, durante o tratamento da giardíase, o fármaco é administrado por via oral, via na qual o fármaco é absorvido para via sistêmica de forma ínfima, sendo os principais efeitos colaterais associados ao trato gastrointestinal, como dor abdominal e diarreia (Mineno & Avery 2003). Devido à baixa absorção, a paromomicina é considerada segura para utilização durante a gestação (Wright et al. 2003).

Em adultos, a dose recomendada é de 500 mg três vezes ao dia, durante 5-10 dias. Já em crianças, a dose é de 30 mg/Kg três vezes ao dia por 5-10 dias (Gardner & Hill 2001). Embora seja bem tolerada, sua eficácia é inferior em relação às demais classes de fármacos utilizados no tratamento da giardíase (Escobedo et al. 2010).

A nitaxozanida (Figura 9) é um derivado 5-nitrotiazólico, desenvolvido no início da década 1980, para utilização como anti-helmíntico de uso veterinário (Rossignol & Maisonneuve 1984). Este, notavelmente o último fármaco aprovado para o tratamento da giardíase em mais de 20 anos, é um pró-fármaco, que precisa receber elétrons no grupo 5-nitro ( $\text{NO}_2$ ) do anel tiazólico para exercer sua atividade biológica. Essa reação de redução ocorre utilizando as mesmas proteínas parasitárias que ativam os fármacos 5-nitroimidazólicos: piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) e ferredoxina (FD) (Escobedo et al. 2010). Após a metabolização, o fármaco atua, possivelmente, inibindo a enzima nitrorreductase1 e causando danos oxidativos ao DNA e proteínas do parasito (Escobedo et al. 2010; Tejman-Yarden & Eckmann 2011).

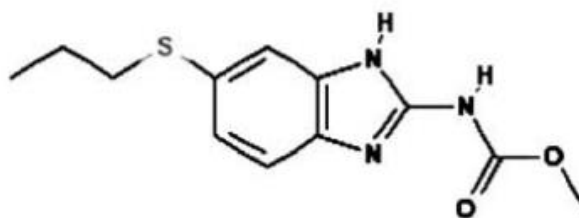


**Figura 9. Estrutura molecular da nitazoxanida.** Fonte: Lalle 2010.

A dose da nitazoxanida indicada para adultos é de 500 mg duas vezes ao dia durante 3 dias; já para crianças entre 4 e 11 anos, é indicada na dose de 200 mg duas vezes durante 3 dias; já em crianças entre 1 a 4 anos, é indicada na dose de 100mg duas vezes ao dia durante 3 dias (Rossignol 2010). O fármaco é geralmente bem tolerado e seus efeitos colaterais incluem dor abdominal, diarreia, vômito, dor de cabeça e alteração na coloração da urina (Escobedo et al. 2010).

O albendazol (Figura 10) é o fármaco da classe dos benzimidazóis que pode ser utilizado para o tratamento da giardíase. Esse fármaco foi desenvolvido como anti-helmíntico na década de 60 (Wright et al. 2003). Estudos iniciais *in vitro* sugeriram que eles poderiam ser utilizados no tratamento da giardíase e, de fato, estudos conduzidos no México, na Índia e em Bangladesh demonstraram a eficácia do fármaco *in vivo*, dependendo da dose e duração do tratamento (Rossignol 2010).

Atualmente, a dose recomendada do albendazol no tratamento da giardíase é de 400 mg uma vez ao dia por 5 dias, tanto para adultos como para crianças (Gardner & Hill 2001). O mecanismo de ação do albendazol é através da ligação com a  $\beta$ -tubulina presente no citoesqueleto do parasito, impedindo sua polimerização e dificultando a captação de glicose do meio externo (Escobedo et al. 2010). Os efeitos colaterais do albendazol, tomados por via oral, são brandos, geralmente envolvendo náuseas, vômito diarreia e dor abdominal (Escobedo et al. 2010).



**Figura 10. Estrutura molecular do albendazol.** Fonte: Lalle 2010.

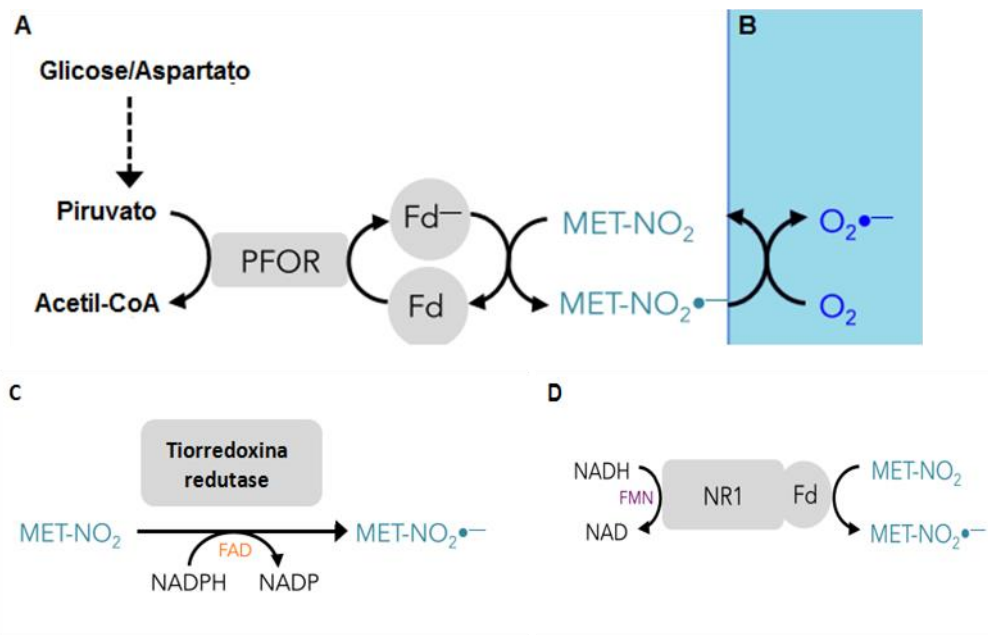
Atualmente, a classe de fármacos de primeira linha para o tratamento da giardíase são os 5-nitroimidazóis. Esses compostos apresentam um grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) na posição cinco do anel imidazólico (Lalle 2010).

Os 5-nitroimidazóis entram na célula por difusão passiva e são pró-fármacos, necessitando sofrer metabolização para exercer sua atividade biológica. Essa metabolização ocorre utilizando proteínas parasitárias que doam elétrons para o grupo 5-nitro ( $\text{NO}_2$ ) dos fármacos 5-nitroimidazólicos (Edward 1993).

Classicamente, duas proteínas parasitárias, atuando em conjunto, cedem elétrons para os 5-nitroimidazóis: a piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) e a ferredoxina (FD) (Figura 11A), tornando os 5-nitroimidazóis tóxicos para as células parasitárias (Edward 1993). Atualmente, outras duas outras proteínas são implicadas na ativação dos 5-nitroimidazóis: a nitrorreductase 1 (Figura 11D) (Nillius et al. 2011) e a tiorredoxina redutase (Figura 11C) (Leitsch et al. 2011). Essa reação ocorre em baixas concentrações de oxigênio, já que o oxigênio pode reoxidar os 5-nitroimidazóis, convertendo-os a sua forma inativa, fenômeno denominado ciclo fútil (Figura 11B), explicando a toxicidade seletiva dos fármacos 5-nitroimidazólicos frente a parasitos anaeróbios ou microaerófilos (Moreno et al. 1984).

No Brasil, os 5-nitroimidazóis são a única classe de fármacos recomendada pelo Ministério da Saúde para o tratamento da giardíase. O metronidazol é indicado em adultos por via oral, em comprimido de 250 mg, tomado duas vezes ao dia por um período de cinco dias. Já para crianças, a dose é de 15 mg/Kg/dia por via oral (máximo de 250 mg), duas vezes ao dia durante cinco dias. O tinidazol é outro medicamento indicado, sendo administrado 2 g em dose única para adultos e 30 mg/Kg em dose única para crianças. Já o secnidazol é administrado por via oral em dose única de 2 g para adultos e 30 mg/Kg em dose única para crianças (Brasil 2010).





**Figura 11. Metabolização dos 5-nitroimidazóis.** A) Reação de redução do metronidazol pelo sistema piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) e ferredoxina (FD); B) Ciclo fútil dos 5-nitroimidazóis; C) Ativação do metronidazol pela tiorredoxina redutase; D) Ativação do metronidazol pela nitrorredutase 1 (NR1). Fonte: adaptado Ansell et al. 2015.

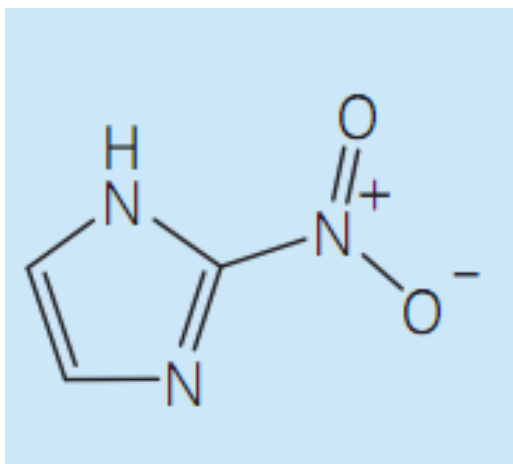
Apesar da sua eficácia, os derivados 5-nitroimidazólicos compartilham uma série de efeitos colaterais, sendo os mais comuns: náuseas (ocorrendo em cerca de 5 a 10% dos pacientes), dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca. Efeitos colaterais mais graves, como toxicidade ao sistema nervoso central e pancreatite foram descritos em seu uso em dosagens elevadas; além disso, neutropenia reversível também já foi atribuída ao uso dessa classe de fármacos (Gardner & Hill 2001).

Os pacientes que utilizam fármacos 5-nitroimidazólicos devem ser alertados a não ingerir bebidas alcoólicas durante e até quatro dias após o término do tratamento (Brasil 2010). A inibição da enzima aldeído desidrogenase, responsável pela metabolização do álcool, por essa classe de fármacos, pode causar efeitos agudos graves, que incluem rubor, crise intensa de vômito, dor de cabeça e dor gastrointestinal (efeito dissulfiram-like) (Gardner & Hill 2001).

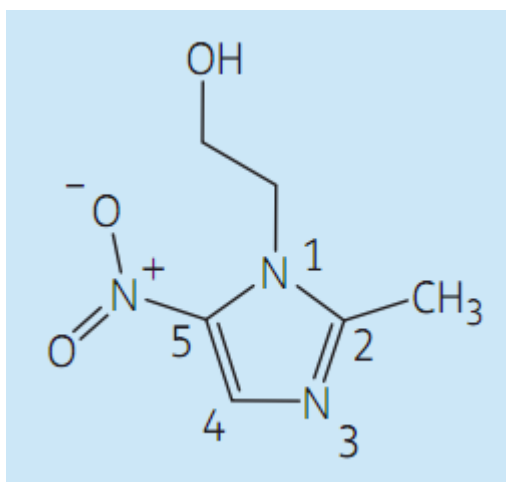
## 1.10 Metronidazol

O metronidazol (1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) é um fármaco 5-nitroimidazólico sintético considerado agente de primeira linha para tratamento de diversos protozoários e outros parasitos microaerófilos e anaeróbios. Este foi introduzido no mercado pela companhia farmacêutica e química francesa Rhône-

Poulenc em 1959 para o tratamento da tricomoníase (Freeman et al. 1997). A princípio, um extrato de bactérias do gênero *Streptomyces* demonstrou ter atividade contra *T. vaginalis* e o composto responsável por essa atividade era a azomicina (Figura 12), um 2-nitroimidazol (Maeda et al. 1953, Dingsdag & Hunter 2017). O metronidazol (Figura 13) foi então sintetizado como um análogo da azomicina, sendo mais ativo frente a trofozoítos de *T. vaginalis* e menos tóxico para as células do hospedeiro (Cosar & Julou 1959, Dingsdag & Hunter 2017).



**Figura 12. Estrutura molecular da azomicina.** Fonte: Dingsdag & Hunter 2017.



**Figura 13. Estrutura molecular do metronidazol.** Fonte: Dingsdag & Hunter 2017.

O metronidazol apresenta um amplo espectro de uso clínico, apresentando atividade parasiticida frente aos protozoários *G. duodenalis*, *T. vaginalis* e *E. histolytica*; Além disso, as bactérias Gram-negativas anaeróbias dos gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e as bactérias Gram-positivas anaeróbias dos gêneros *Clostridium* e *Peptostreptococcus* apresentam susceptibilidade ao fármaco (Nagel & Aronoff 2015).

Alguns esquemas terapêuticos para erradicação de *Helicobacter pylori* utilizam o metronidazol em combinação com outros agentes antimicrobianos; o fármaco também é indicado para vaginose causada pelo bacilo Gram-variável *Gardnerella vaginalis* (Nagel & Aronoff 2015).

Após administração oral, o metronidazol é rapidamente absorvido e sua biodisponibilidade se aproxima de 100% (Edward 1993). A administração do fármaco junto com alimentos é indicada, pois diminui os efeitos gastrointestinais provocados pelo fármaco sem, no entanto, alterar sua biodisponibilidade (Lau et al. 1992). Ele é um fármaco lipofílico que apresenta um volume amplo de distribuição, permitindo a sua concentração em níveis terapêuticos em vários locais, como saliva, bile, sistema nervoso central e até mesmo em abscessos (Lau et al. 1992; Edward 1993).

Estudos em ratos e camundongos comprovaram a mutagenicidade e carcinogenicidade do metronidazol (Voogd 1981). Como o metronidazol é capaz de atravessar a barreira hemato-placentária e pode ser excretado por meio do leite materno, ele deve ser evitado no primeiro trimestre de gestação e durante a amamentação. No entanto, estudos realizados em gestantes expostas ao metronidazol não comprovaram um aumento de más-formações fetais (Diav-Citrin et al. 2001).

Os 5-nitroimidazóis diferem com relação ao tempo de meia-vida plasmático. Enquanto o tempo de meia-vida do metronidazol é de 8 horas, o do tinidazol e do secnidazol são de 15 e 17 horas, respectivamente; isso permite que os dois últimos possam ser utilizados em dose única (Lamp et al. 1999).

Além do álcool, existe uma interação importante que envolve o metronidazol e o anticoagulante varfarina; ao inibir a metabolização da varfarina, o metronidazol aumenta seus níveis plasmáticos, o que pode acarretar em sangramento. Portanto, deve-se evitar o uso desses fármacos de forma concomitante (Miljkovic et al. 2004).

## **1.11 Resistência parasitária ao metronidazol**

Os fármacos 5-nitroimidazólicos são bastante eficazes no tratamento da giardíase, e a taxa de cura com pacientes que os utilizam para o tratamento da doença é de cerca de 90% (Tejman-Yarden & Eckmann 2011). Além da resistência aos fármacos, a persistência do parasitismo pode estar relacionada a doses insuficientes do medicamento, reinfecções e imunossupressão (Nash 2001).

Um trabalho recente aponta um crescimento no número de casos refratários

de giardíase após tratamento com 5-nitroimidazóis em um Hospital de Medicina Tropical de Londres, em pacientes que retornavam de viagens ao exterior, principalmente da Índia; o estudo conduzido entre o período de 2008-2013 demonstrou um aumento significativo de persistência parasitária após tratamento. Os autores observaram que, durante o ano de 2008, o número de casos de falha terapêutica com o uso de 5-nitroimidazóis foi de 15,1%. Esse número aumentou para 20,6% em 2011 e 40,2% em 2013 (Nabarro et al. 2015).

Além disso, alguns estudos isolaram parasitos menos susceptíveis em amostras clínicas de fezes oriundas de pacientes com giardíase. Farbey et al. 1995 encontraram uma exorbitante variação na susceptibilidade ao metronidazol em 29 isolados clínicos analisados; a  $IC_{50}$ , concentração do fármaco necessária para inibir 50% do crescimento, variou de 0,0094  $\mu$ M até 154  $\mu$ M, uma diferença maior do que 16.000 vezes entre os isolados de maior e menor susceptibilidade. Lemée et al. 2000 conseguiram associar a falha terapêutica de 3 pacientes ao metronidazol a valores de  $IC_{50}$  maiores *in vitro* em comparação ao de pacientes que obtiveram cura clínica com o uso do mesmo fármaco.

Cepas resistentes ao metronidazol foram induzidas por vários autores. As enzimas que atuam na ativação do metronidazol são sugeridas como prováveis causas da resistência das cepas induzidas *in vitro*, já que alterações no nível de expressão gênica ou atividade enzimática/capacidade de promover oxidorredução da piruvato-ferredoxina oxidorredutase, ferredoxina e nitrorredutase 1 foram relatadas (Boreham et al. 1988; Townson et al. 1992, Argüello-García et al. 2009). No entanto, outras proteínas que não estão diretamente ligadas à ativação do metronidazol, como a glutamato desidrogenase (GDH), têm apresentado alterações em sua expressão gênica em cepas resistentes (Müller et al. 2007; Ansell et al. 2015).

O comportamento das cepas resistentes ao metronidazol não é completamente caracterizado, sugerindo que múltiplos fatores podem levar à resistência de *G. duodenalis* ao metronidazol, como alterações genômicas, na expressão gênica, na abundância proteica, na atividade enzimática, na concentração de metabólitos e até mesmo a presença de bombas de efluxo no parasito. Todas essas mudanças podem acarretar em alterações na susceptibilidade de *G. duodenalis* aos fármacos utilizados na prática clínica (Ansell et al. 2015).

## 1.12 Justificativa

A giardíase é uma doença de alta prevalência nos países em desenvolvimento, sendo o protozário mais comum entre crianças de 0-2 anos. Nessa população, a giardíase pode trazer consequências graves, como deficiências nutricionais, que podem levar a déficits no crescimento pômbero-estatural e cognitivos. Além disso, atualmente, a giardíase tem sido associada a outras morbidades, como a síndrome do intestino irritável, síndrome da fadiga crônica e até mesmo artrite.

Em boa parte dos casos, o tratamento da giardíase com fármacos 5-nitroimidazólicos é eficaz. Entretanto dados atuais demonstram um aumento dos casos de falha terapêutica na infecção por *G. duodenalis* após o tratamento com essa classe de fármacos. Embora a persistência do parasitismo por *G. duodenalis* após tratamento possa estar associado ao uso de doses inadequadas do fármaco, reinfecções e imunossupressão, a resistência do parasito ao fármaco é uma das possibilidades que têm sido levantadas e estudos mais aprofundados sobre o tema precisam ser realizados.

Um fato que alerta para a possibilidade de surgimento de resistência de *G. duodenalis* é que em áreas onde a prevalência é alta e as reinfecções ocorrem com frequência, é comum o uso indiscriminado de fármacos antiparasitários pela população, o que aumenta a possibilidade de que cepas resistentes possam estar sendo selecionadas por pressão seletiva aos fármacos utilizados na prática clínica.

Para estudos sobre resistência de *G. duodenalis*, é necessária a avaliação de cepas resistentes obtidas *in vitro* por meio da pressão seletiva aos fármacos. O entendimento dos mecanismos que levam a essa resistência são de fundamental importância, a fim de ajudar na compreensão dos casos de falha terapêutica na prática clínica.

Classicamente, o sistema formado pela enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) e pela ferredoxina (FD) é associado à ativação do metronidazol. Além disso, o possível papel da glutamato desidrogenase (GHD), atuando indiretamente, no processo de resistência do parasito vem sendo hipotetizado. Logo, alterações nessas proteínas são potencialmente capazes de alterar a susceptibilidade de *G. duodenalis* aos fármacos 5-nitroimidazólicos. Apesar de existirem estudos sobre a expressão gênica e atividade enzimática/capacidade de promover oxidorredução da piruvato-ferredoxina oxidorreductase, ferredoxina e

glutamato desidrogenase em cepas resistentes induzidas *in vitro*, ainda é necessário investigar se existem alterações nucleotídicas nesses genes, levando à resistência.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Investigar se a exposição de *G. duodenalis* ao metronidazol *in vitro* leva a alterações nucleotídicas em genes associados a menor susceptibilidade ao fármaco.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar se a exposição prévia de *G. duodenalis* ao metronidazol induz a uma diminuição de susceptibilidade a esse fármaco.
- Investigar se a indução *in vitro* de resistência ao metronidazol em cepa de *G. duodenalis* leva a alterações nucleotídicas em genes associados à resistência (*pfor*, *gdh* e *fd*).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo axênico de trofozoítos de *Giardia duodenalis***

Trofozoítos de *G. duodenalis* do clone W6, cepa WB [ATCC50803], foram cultivados em meio TYI-S-33 (Keister 1983), em pH 7, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas, Brasil), em tubos de centrífuga (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) com capacidade de 15 mL. Os repiques foram realizados duas vezes por semana, durante a fase estacionária de crescimento do parasito. Para o repique, os tubos contendo o parasito foram centrifugados (centrífuga IEC CL40R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) a 840 g durante 5 minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 mL de meio de cultivo. Para inibir a adsorção dos parasitos, os tubos foram incubados em gelo durante 20 minutos e agitados com o auxílio de um vórtex (Vortex Mix, Fisher Scientific, Hampton, EUA). Um total de 500 µL de cultivo original foi adicionado em três tubos de centrífuga contendo meio de cultivo novo com 10% de soro fetal bovino com um volume final de 10 mL. Após o repique, os tubos foram incubados em estufa a 37°C (Incubadora de CO<sub>2</sub> MCO-19AIC, Panasonic Biomedical, Osaka, Japão).

#### **3.2 Exposição do cultivo de *Giardia duodenalis* ao metronidazol e determinação da concentração necessária para inibir 50% do crescimento parasitário (IC<sub>50</sub>)**

Após o estabelecimento do cultivo, foram definidos grupos experimentais onde *G. duodenalis* era exposto a diferentes concentrações de metronidazol (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), conforme descrito a seguir: grupo 1 - exposto continuamente a 5 µM de metronidazol (MTZ5); grupo 2 - exposto continuamente a 10 µM de metronidazol (MTZ10); grupo 3 - exposto continuamente a 20 µM de metronidazol (MTZ20); grupo 4 - exposto continuamente a 80µM de metronidazol (MTZ80). Os grupos foram cultivados por um período de 16 semanas. Foram utilizados como controles: grupo 5 - sem exposição ao metronidazol (SMTZ); grupo 6 - exposto a 0,05% de dimetilsulfóxido (Sigma, EUA), veículo no qual o metronidazol foi diluído (CDMSO).



A IC<sub>50</sub>, concentração necessária para inibir 50% do crescimento parasitário, foi determinada usando a metodologia descrita por Bénéré et al. 2007. Brevemente, 5x10<sup>4</sup> parasitos de cada grupo experimental foram plaqueados, em triplicata, em placa de 96 poços de fundo chato (Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA), na qual havia sido realizada uma diluição seriada de metronidazol que variou de 20 - 0,31 µM, num volume final de 300 µL por poço. Cinco poços foram preenchidos apenas com meio de cultivo, para servir de branco da reação. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante um período de 72 horas. Após este período, o crescimento parasitário foi avaliado utilizando a resazurina (Alamar Blue®, Sigma, EUA) diluída em PBS, numa concentração final de 8 µg/mL. A resazurina é um reagente colorimétrico azul que, ao sofrer reação de redução promovida pelo parasito, forma um composto de cor rosa, indicando a viabilidade do parasito. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *G. duodenalis* pode espontaneamente reduzir a resazurina devido aos componentes presentes em sua composição. Portanto, antes de se adicionar a resazurina, todo o meio de cultura presente nas placas era cuidadosamente retirado com auxílio de pipeta multicanal (Finnpipette®, Labsystems, Lilydale, Austrália), a fim de expor a resazurina apenas às formas trofozoíticas aderidas à placa. Após um período de 4 horas, as placas eram analisadas por meio de um fluorímetro ( $\lambda_{\text{ex}}$  560 nm -  $\lambda_{\text{em}}$  590 nm) (SpectraMaxM2e, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

Os ensaios para cada grupo experimental foram realizados em triplicata e os resultados da IC<sub>50</sub> foram determinados utilizando o software GrafPad Prism 6.0 ([www.grafpad.com/scientific-software/prism/](http://www.grafpad.com/scientific-software/prism/)). As análises estatísticas entre o IC<sub>50</sub> dos grupos experimentais foram realizadas utilizando o teste ANOVA.

### **3.3 Extração de DNA de cultivo axênico de trofozoítos de *Giardia duodenalis***

Para obtenção de DNA, os parasitos de cada grupo experimental foram centrifugados a 750 g durante 15 minutos a 4°C, a fim de se obter um *pellet* com as formas trofozoíticas. O *pellet* era transferido para um tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com capacidade de 2 mL.

Para realizar a lise das formas trofozoíticas, foi utilizado 1 mL de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA), para cada 10<sup>7</sup> parasitos. Posteriormente, realizou-se

centrifugação a 10.000g durante um período de 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se, então, 500 µL de etanol absoluto (Sigma, EUA) para cada mL de DNAzol, e o tubo foi homogeneizado lentamente por inversão, a temperatura ambiente. A fim de precipitar o DNA, foi realizada uma nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e realizou-se a lavagem do DNA com 1 mL de etanol 75%; após a reprecipitação do DNA, o etanol foi retirado com auxílio de pipeta e o processo foi repetido mais duas vezes.

Após a última lavagem, o etanol foi retirado e o restante foi submetido a evaporação espontânea, a temperatura ambiente. Por fim, um volume de 200 µL de hidróxido de sódio (Sigma, EUA) 8 mM foi adicionado e homogeneizado até a completa dissolução do DNA e preservado a - 20°C até o momento de sua utilização (Freezer CBU30EB, Consul, São Bernardo do Campo, Brasil).

### **3.4 Padronização da reação em cadeia da polimerase para amplificação dos genes *pfor*, *fd* e *gdh* de *Giardia duodenalis***

O DNA extraído do cultivo axênico de *G. duodenalis* dos diferentes grupos experimentais foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de gene conservado da glutamato desidrogenase (*gdh*) e genes que codificam para proteínas possivelmente associadas à resistência do parasito ao metronidazol, como piruvato-ferredoxina oxidorreductase (*pfor*) e ferredoxina (*fd*). O fragmento amplificado de *pfor* (342 pares de bases) contém a região codificante do sítio catalítico da enzima (3Fe-4S e 4Fe-4S) (Argüello-García et al. 2009); o fragmento amplificado de *fd* (421 pares de bases) contém a região de ligação 2Fe-2S da ferredoxina (Nixon et al. 2002) e o fragmento da região codificante de *gdh* contém 532 pares de bases (Cacciò & Ryan 2008).

A reação em cadeia da polimerase foi desenvolvida no termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemanha) e as amostras tinham um volume final de 50 µL. As concentrações finais de dNTP, Taq polimerase, PCR *buffer*, MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, EUA) e *primers* estão descritas na Tabela 1. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 2.

A qualidade dos produtos amplificados na PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Sigma, EUA) em tampão TBE (Tris base [89mM], ácido bórico [89mM] e EDTA [2mM] ) (Sigma, EUA). Brevemente, 8µL do produto da PCR

de cada grupo experimental acrescido de 2  $\mu$ L de tampão de amostra foi submetido à eletroforese com uma diferença de potencial de 60 V, durante aproximadamente uma hora e meia. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o 100 pb *ladder* (Invitrogen, EUA). O gel foi corado durante 15 minutos utilizando o GelRed® (Biotium, Hayward, EUA). A imagem do gel foi capturada por meio de um equipamento de fotodocumentação de gel (GelDoc2000, Bio-Rad, Hércules, EUA).

**Tabela 1. Sequência dos pares de *primers* e concentração final dos reagentes após padronização da reação em cadeia da polimerase para os genes *pfor*, *fd* e *gdh*.**

Lócus	<i>Primers</i> (5'-3')	MgCl <sub>2</sub>	Taq	<i>Primer</i> fwd	<i>Primer</i> rev	PCR <i>buffer</i>	dNTP
<i>pfor</i>	fwd-TGCGGTTTC TGCTCTGTCCAG	2mM	1U	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1X	200 mM
	rev-GTTGCAGCTC TCCGTGTCGAT						
<i>fd</i>	fwd-GAGACTCCA TGTCTCTAC	2mM	1,25U	0,5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1X	200 mM
	rev-CGCTTGCAA GAATGTCAC						
<i>gdh</i>	fwd-ATGACYGAG CTYCAGAGGCACGT	3mM	1U	0,2 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	1x	200 mM
	rev- GTGGCGCAR GGCATGATGCA						

**Tabela 2. Condições de amplificação para cada reação em cadeia da polimerase para os genes *pfor*, *fd* e *gdh*.**

Lócus	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos
<i>pfor</i>	94°C / 30 s	70°C / 60s	72°C / 5min	35
<i>fd</i>	94°C / 30 s	54°C / 30s	72°C / 5min	35
<i>gdh</i>	94°C / 30 s	55°C / 30s	72°C / 7min	35

### 3.5 Purificação, sequenciamento e análise das sequências dos fragmentos gênicos de *pfor*, *fd* e *gdh*

Os fragmentos gênicos obtidos na reação de PCR, para cada um dos *primers* utilizados, foram purificados com o uso do QIAquick® - PCR purification Kit (Qiagen,

Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação, os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento com a utilização do BigDye® Terminador v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para a reação, o volume final foi de 10 µL: 2,3 µL de água destilada, 3,2 µL dos respectivos *primers* na concentração de 1 pmol/µL, 1 µL do mix big dye terminator, 1,5 µL de tampão proveniente do próprio kit e 2 µL do produto de PCR purificado. As condições utilizadas na reação foram: 40 ciclos de 94°C/10s, 50°C/5s e 60°C/240s. Cada reação foi realizada em triplicata e o experimento foi repetido três vezes a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados.

As etapas seguintes de precipitação e eletroforese foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento de DNA/FIOCRUZ (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, EUA) (Otto et al. 2007).

Os eletroferogramas foram analisados e sua qualidade foi verificada pelo programa Chromas 2.4 (<http://tecnelysium.com.au/wp/chormas/>). A confirmação de *G. duodenalis* e do gene sequenciado foi realizada pelo Basic Local Alignment Search Tool usando nucleotídeo (BLASTn) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e os consensos obtidos pelo CAP3 Sequence Assembly Program (<http://douda.prabi.fb/software/cap3>). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências nucleotídicas da piruvato-ferredoxina oxidorreductase (*pfor*), ferredoxina (*fd*) e glutamato desidrogenase (*gdh*) de *G. duodenalis* existentes no GenBank pelo algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) no pacote Mega 7.0 (<http://www.megasoftware.net>) (Kumar et al. 2016).

## 4 RESULTADOS

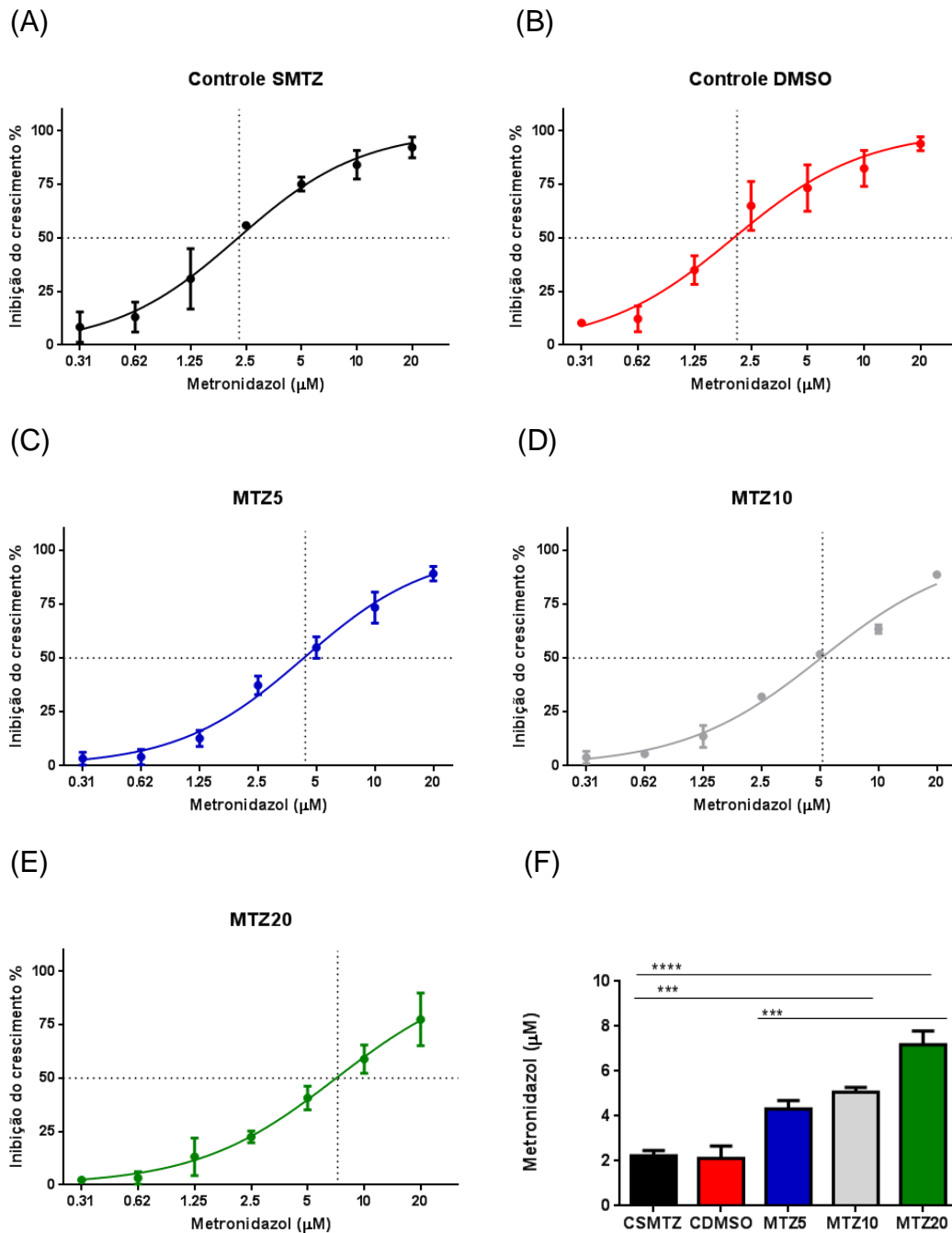
### 4.1 Efeito da exposição ao metronidazol na susceptibilidade de *Giardia duodenalis* em cultivo axênicos.

Os trofozoítos de *G. duodenalis* foram mantidos em pressão farmacológica por um período de 16 semanas, como descrito na metodologia. Os experimentos para determinação da IC<sub>50</sub> foram realizados em triplicata. Os resultados correspondem à média dos três experimentos mais o erro padrão e estão demonstrados na Figura 13.

O valor da IC<sub>50</sub> do grupo sem exposição ao metronidazol (SMTZ) foi de 2,26 ± 0,3 µM; já o grupo exposto a 0,05% de dimetilsulfóxido (CDMSO) apresentou valor da IC<sub>50</sub> de 2,02 ± 0,3 µM; o grupo exposto continuamente a 5 µM de metronidazol (MTZ5) apresentou valor da IC<sub>50</sub> de 4,3 ± 0,6 µM; o grupo exposto continuamente a 10 µM (MTZ10) apresentou um valor da IC<sub>50</sub> de 5,07 ± 0,7 µM; o grupo exposto continuamente a 20 µM de metronidazol (MTZ20) apresentou um valor da IC<sub>50</sub> de 7,09 ± 0,9 µM. Não foi possível determinar o valor da IC<sub>50</sub> do grupo que foi exposto continuamente em cultivo axênico a 80 µM de metronidazol (MTZ80), possivelmente devido à concentração elevada do fármaco utilizada durante o cultivo desse grupo.

Não houve diferença estatística entre os valores da IC<sub>50</sub> entre os grupos usados como controle (SMTZ e CDMSO), indicando que o dimetilsulfóxido utilizado para diluir o metronidazol não teve impacto no crescimento parasitário. A IC<sub>50</sub> dos grupos experimentais aumentou de forma proporcional à concentração do fármaco utilizada nos cultivos *in vitro* dos parasitos. Os valores da IC<sub>50</sub> dos grupos MTZ5, MTZ10, MTZ20 foram significativamente mais elevados do que os dos grupos SMTZ e CDMSO.

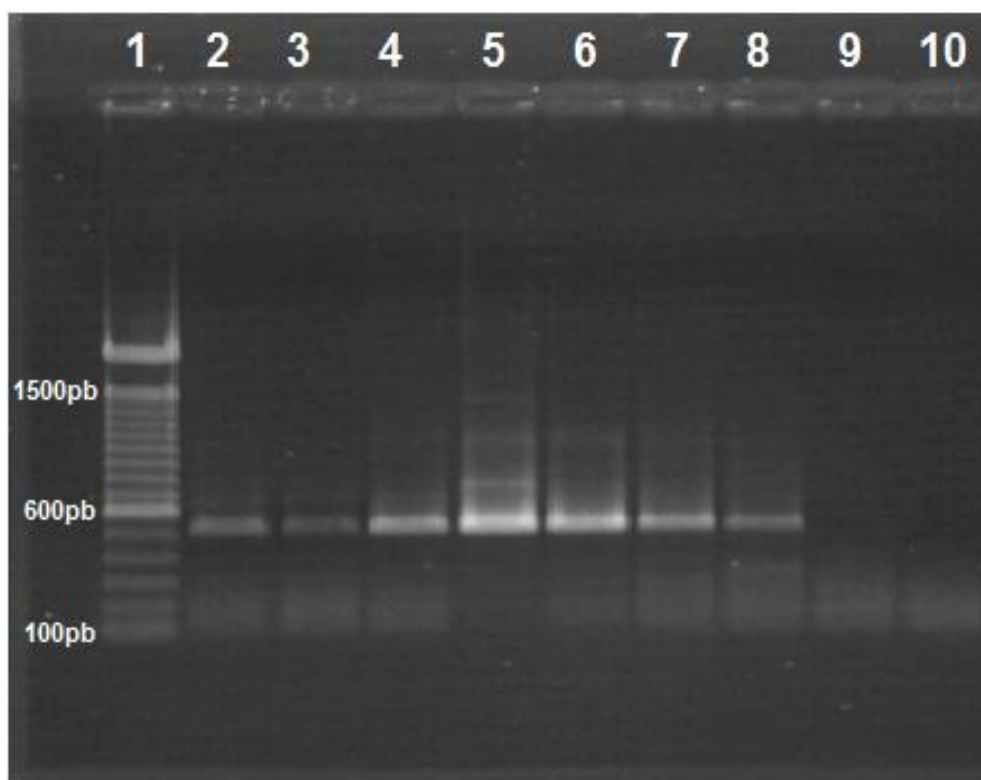
Esses resultados nos indicam que a exposição dos parasitos em cultivo axênico a crescentes concentrações de metronidazol diminuiu gradativamente sua susceptibilidade ao fármaco, sugerindo que os parasitos que sobreviveram à exposição, possivelmente, apresentam alterações a nível genômico, de expressão gênica ou proteica e até mesmo metabólicos, que justifiquem esse fenômeno.



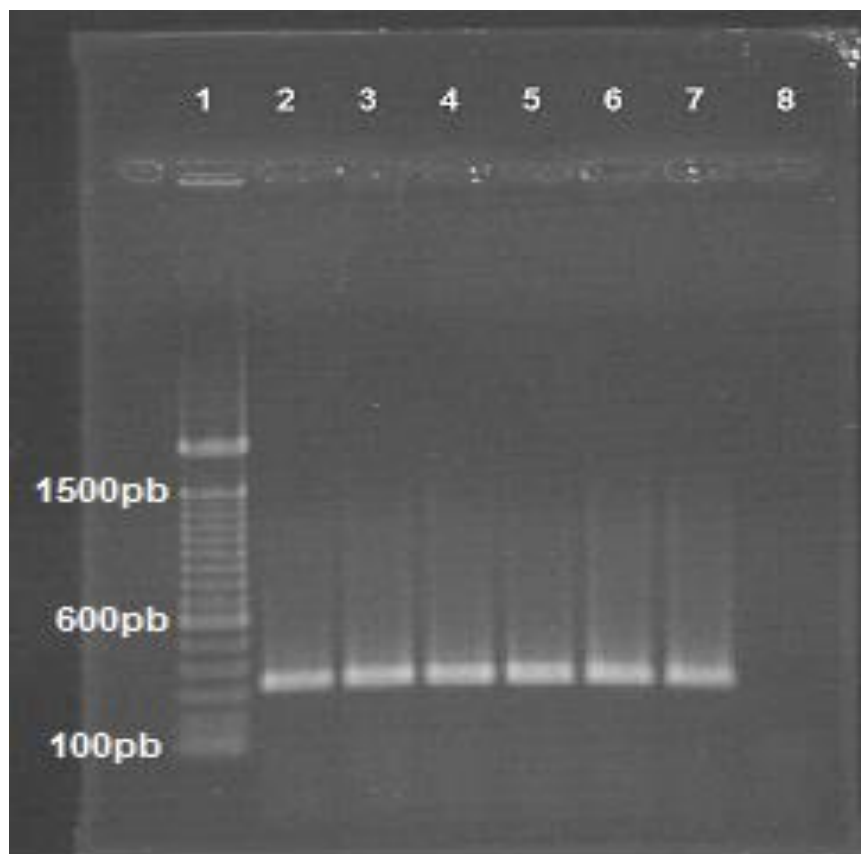
**Figura 14. Concentração de metronidazol necessária para inibir 50% do crescimento parasitário em cepas WB de *Giardia duodenalis*.** Os parasitos sem exposição ao metronidazol (SMTZ) e expostos a 0,05% de dimetilsulfóxido (CDMSO) e os parasitos expostos ao metronidazol nas concentrações de 5 $\mu\text{M}$  (MTZ5), 10 $\mu\text{M}$  (MTZ10) e 20 $\mu\text{M}$  (MTZ20) foram cultivados por 16 semanas. Para o cálculo da  $\text{IC}_{50}$  dos grupos acima, os parasitos oriundos dos cultivos com diferentes concentrações de metronidazol foram reexpostos a concentrações do fármaco variando de 20 – 0,31  $\mu\text{M}$ . A  $\text{IC}_{50}$  é indicada na curva através da interseção da concentração de metronidazol (eixo x) com o valor de inibição de 50% do crescimento (eixo y). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os gráficos são representativos de três experimentos independentes e os resultados foram expressos em média e erro padrão. (A) SMTZ ( $\text{IC}_{50} = 2,26 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ); (B) CDMSO ( $\text{IC}_{50} = 2,02 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ); (C) MTZ5 ( $\text{IC}_{50} = 4,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ); (D) MTZ10 ( $\text{IC}_{50} = 5,07 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ); (E) MTZ20 ( $\text{IC}_{50} = 7,09 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ); (F) análise estatística (Teste ANOVA) comparando os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos grupos. p<0,05 (\*), p<0,01(\*\*), p<0,001 (\*\*\*) , p<0,0001(\*\*\*\*).

## 4.2 Amplificação de fragmentos gênicos de região conservada *gdh* e associados à resistência *pfor* e *fd* de *Giardia duodenalis* em cultivo axênico.

Após a padronização da PCR para cada par de *primer*, todos os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. A amplificação gênica foi realizada nos parasitos oriundos dos grupos expostos ao metronidazol, bem como dos grupos controles. O fragmento correspondente aos genes *gdh* (532 pb), *pfor* (342 pb) e *fd* (421 pb) estão representados nas Figura 15, Figura 16 e Figura 17, respectivamente.

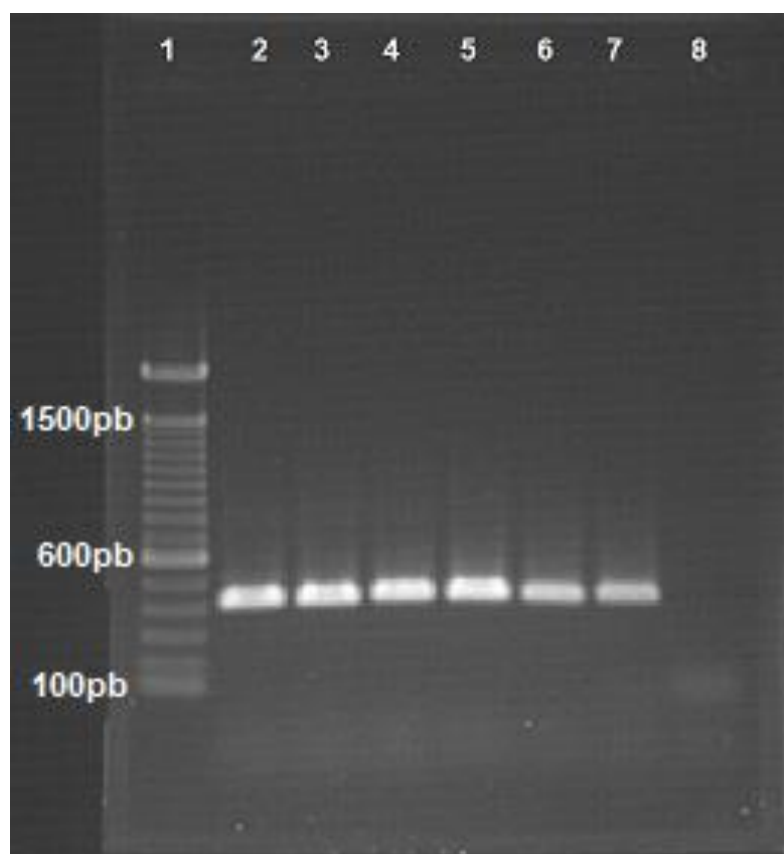


**Figura 15. Amplificação de fragmento gênico conservado *gdh* de *Giardia duodenalis*.** Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para fragmento do gene *gdh* (532pb) de *G. duodenalis* oriunda de cultivo axênico. 1: padrão de peso molecular (100pb); 2: MTZ80; 3: MTZ20; 4: MTZ10; 5: MTZ5; 6: CDMSO; 7: SMTZ; 8: controle positivo; 9: controle negativo (*Trichomonas vaginalis*); 10: branco (reagentes da PCR sem adição de DNA).



**Figura 16. Amplificação de fragmento gênico associado à resistência *pfor* de *Giardia duodenalis*.** Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para fragmento do gene *pfor* (342pb) de *G. duodenalis* oriunda de cultivo axênico. 1: padrão de peso molecular (100pb); 2: SMTZ; 3: CDMSO; 4: MTZ5; 5: MTZ10; 6: MTZ20; 7: MTZ80; 8: branco (reagentes da PCR sem adição de DNA).





**Figura 17. Amplificação de fragmento gênico associado à resistência *fd* de *Giardia duodenalis*.** Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos amplificados na reação em cadeia da polimerase para fragmento do gene *fd* (421pb) de *G. duodenalis* oriunda de cultivo axênico. 1: padrão de peso molecular (100pb); 2: SMTZ; 3: CDMSO; 4: MTZ5; 5: MTZ10; 6: MTZ20; 7: MTZ80; 8: branco (reagentes da PCR sem adição de DNA).

### **4.3 Sequenciamento de fragmento conservado da glutamato desidrogenase (*gdh*) e dos genes associados à resistência piruvato-ferredoxina oxidorreductase (*pfor*) e ferredoxina (*fd*) em cepa axênica de *Giardia duodenalis* expostas e não-expostas ao metronidazol.**

O sequenciamento do gene conservado de *gdh* (Figura 18) e dos genes *pfor* (Figura 19) e *fd* (Figura 20), que vêm sendo associados à resistência de *G. duodenalis* ao metronidazol, não identificou alterações nucleotídicas em nenhum dos grupos experimentais (MTZ5, MTZ10, MTZ20 e MTZ80). O DNA extraído do grupo MTZ80 foi sequenciado para todos os genes, apesar de não ter sido possível determinar seu IC<sub>50</sub>. O padrão nucleotídico dos parasitos oriundos dos cultivos expostos ao metronidazol foi semelhante aos dos grupos controle. As figuras representam as sequências nucleotídicas no sentido 5´- 3´ para cada gene analisado e identificados na seguinte ordem microrganismo/ gene/ nome do grupo. A sequência de *pfor* e *fd* incluem o sítio de ligação dos grupamentos Fe-S, fundamentais para as reações de oxidorredução de *G. duodenalis*, nas proteínas codificadas por esses genes.

Apesar de ocorrer uma diminuição na susceptibilidade de *G. duodenalis* ao metronidazol nos grupos expostos ao fármaco *in vitro*, ela não pode ser associada a alterações nucleotídicas dos genes que classicamente atuam na ativação do metronidazol (*pfor* e *fd*) nem no gene conservado (*gdh*), cuja diminuição na expressão gênica contribui para o processo de menor susceptibilidade ao metronidazol em algumas cepas resistentes *in vitro*.

Giardia duodenalis gdh SMTZ	A	A	G	C	G	C	T	G	A	G	G	A	A	C	G	A	G	T	T	C	A	C	A	G	G	C	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	G	C	A	A	G	A	A	C	G	T	C	A	A	G	T	G	G	G	C	G	G	T	C	T	T	C	A	T	C	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	T	A	T	G	G	C	G	C	T	G	T	C	
Giardia duodenalis gdh CDMSO	A	A	G	C	G	C	T	G	A	G	G	A	A	C	G	A	G	T	T	C	A	C	A	G	G	C	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	G	C	A	A	G	A	A	C	G	T	C	A	A	G	T	G	G	G	C	G	G	T	C	T	T	C	A	T	C	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	T	A	T	G	G	C	G	C	T	G	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ5	A	A	G	C	G	C	T	G	A	G	G	A	A	C	G	A	G	T	T	C	A	C	A	G	G	C	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	G	C	A	A	G	A	A	C	G	T	C	A	A	G	T	G	G	G	C	G	G	T	C	T	T	C	A	T	C	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	T	A	T	G	G	C	G	C	T	G	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ10	A	A	G	C	G	C	T	G	A	G	G	A	A	C	G	A	G	T	T	C	A	C	A	G	G	C	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	G	C	A	A	G	A	A	C	G	T	C	A	A	G	T	G	G	G	C	G	G	T	C	T	T	C	A	T	C	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	T	A	T	G	G	C	G	C	T	G	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ20	A	A	G	C	G	C	T	G	A	G	G	A	A	C	G	A	G	T	T	C	A	C	A	G	G	C	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	G	C	A	A	G	A	A	C	G	T	C	A	A	G	T	G	G	G	C	G	G	T	C	T	T	C	A	T	C	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	T	A	T	G	G	C	G	C	T	G	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ80	A	A	G	C	G	C	T	G	A	G	G	A	A	C	G	A	G	T	T	C	A	C	A	G	G	C	G	T	C	C	T	C	A	C	A	G	G	C	A	A	G	A	A	C	G	T	C	A	A	G	T	G	G	G	C	G	G	T	C	T	T	C	A	T	C	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	T	A	T	G	G	C	G	C	T	G	T	C	
Giardia duodenalis gdh SMTZ	T	A	C	T	T	C	C	T	G	A	G	G	A	G	A	T	G	T	G	C	A	A	G	G	A	C	A	A	C	A	C	T	G	T	G	A	T	C	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	C	G	T	C	C	T	T	C	T	T	T	C	T	G	G	C	T	C	C	G	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	C	A	G	T	T	G	C	T	T	G	C	T	T	G	C	G	A	G
Giardia duodenalis gdh CDMSO	T	A	C	T	T	C	C	T	G	A	G	G	A	G	A	T	G	T	G	C	A	A	G	G	A	C	A	A	C	A	C	T	G	T	G	A	T	C	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	C	G	T	C	C	T	T	C	T	T	T	C	T	G	G	C	T	C	C	G	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	C	A	G	T	T	G	C	T	T	G	C	G	A	G				
Giardia duodenalis gdh MTZ5	T	A	C	T	T	C	C	T	G	A	G	G	A	G	A	T	G	T	G	C	A	A	G	G	A	C	A	A	C	A	C	T	G	T	G	A	T	C	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	C	G	T	C	C	T	T	C	T	T	T	C	T	G	G	C	T	C	C	G	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	T	T	G	C	G	A	G											
Giardia duodenalis gdh MTZ10	T	A	C	T	T	C	C	T	G	A	G	G	A	G	A	T	G	T	G	C	A	A	G	G	A	C	A	A	C	A	C	T	G	T	G	A	T	C	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	C	G	T	C	C	T	T	C	T	T	T	C	T	G	G	C	T	C	C	G	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	T	T	G	C	G	A	G											
Giardia duodenalis gdh MTZ20	T	A	C	T	T	C	C	T	G	A	G	G	A	G	A	T	G	T	G	C	A	A	G	G	A	C	A	A	C	A	C	T	G	T	G	A	T	C	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	C	G	T	C	C	T	T	C	T	T	T	C	T	G	G	C	T	C	C	G	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	T	T	G	C	G	A	G											
Giardia duodenalis gdh MTZ80	T	A	C	T	T	C	C	T	G	A	G	G	A	G	A	T	G	T	G	C	A	A	G	G	A	C	A	A	C	A	C	T	G	T	G	A	T	C	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	C	G	T	C	C	T	T	C	T	T	T	C	T	G	G	C	T	C	C	G	G	C	A	A	C	G	T	T	G	C	T	T	G	C	G	A	G											
Giardia duodenalis gdh SMTZ	A	A	G	C	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	G	G	C	G	C	A	A	A	G	G	T	C	C	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	G	A	C	C	A	T	T	G	T	C	G	A	C	A	A	G	A	C	G	G	G	T	T	C	A	A	C	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	G	C	C	A	C	C	T	C	
Giardia duodenalis gdh CDMSO	A	A	G	C	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	G	G	C	G	C	A	A	A	G	G	T	C	C	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	G	A	C	C	A	T	T	G	T	C	G	A	C	A	A	G	A	C	G	G	G	T	T	C	A	A	C	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	G	C	C	A	C	C	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ5	A	A	G	C	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	G	G	C	G	C	A	A	A	G	G	T	C	C	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	G	A	C	C	A	T	T	G	T	C	G	A	C	A	A	G	A	C	G	G	G	T	T	C	A	A	C	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	G	C	C	A	C	C	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ10	A	A	G	C	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	G	G	C	G	C	A	A	A	G	G	T	C	C	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	G	A	C	C	A	T	T	G	T	C	G	A	C	A	A	G	A	C	G	G	G	T	T	C	A	A	C	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	G	C	C	A	C	C	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ20	A	A	G	C	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	G	G	C	G	C	A	A	A	G	G	T	C	C	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	G	A	C	C	A	T	T	G	T	C	G	A	C	A	A	G	A	C	G	G	G	T	T	C	A	A	C	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	G	C	C	A	C	C	T	C	
Giardia duodenalis gdh MTZ80	A	A	G	C	T	C	A	T	T	C	A	G	C	T	C	G	G	C	G	C	A	A	A	G	G	T	C	C	T	C	A	C	C	T	T	C	T	C	A	G	A	C	T	C	C	A	A	C	G	G	G	A	C	C	A	T	T	G	T	C	G	A	C	A	A	G	A	C	G	G	G	T	T	C	A	A	C	G	A	G	G	A	A	G	C	T	G	G	C	C	A	C	C	T	C	

**Figura 18. Sequenciamento de fragmento gênico conservado da glutamato desidrogenase (*gdh*) de *Giardia duodenalis* expostas e não-expostas ao metronidazol.** Sequência de bases nucleotídicas do gene *gdh* de *G. duodenalis* dos grupos controles (SMTZ e CDMSO) e experimentais (MTZ5, MTZ10, MTZ20 e MTZ 80). O sequenciamento foi realizado a partir do produto purificado da PCR com primer específico para o gene. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o software Mega 7.0.





## 5 DISCUSSÃO

A giardíase é uma doença infectoparasitária que apresenta uma incidência de aproximadamente 280 milhões de casos a cada ano (Lane & Lloyd 2002; Lalle 2010). A doença apresenta grande prevalência em países em desenvolvimento quando comparada a países desenvolvidos (Marshall et al. 1997), possivelmente por estar fortemente associada a condições inadequadas de saneamento básico e dificuldade de acesso a serviços de saúde, constituindo um grave problema de saúde pública.

O tratamento de primeira escolha para o tratamento da giardíase consiste no uso de fármacos 5-nitroimidazólicos, principalmente o metronidazol (Gardner & Hill 2001). O tratamento da doença com fármacos 5-nitroimidazólicos geralmente é eficaz, com taxas de cura que se aproximam de 90% (Tejman-Yarden & Eckmann 2011). Porém, dados provenientes do Hospital de Doenças Tropicais de Londres apontam para um crescimento expressivo no número de casos de falha terapêutica em pacientes que utilizaram fármacos 5-nitroimidazólicos para o tratamento da giardíase (Nabarro et al. 2015). Por se tratar de um estudo realizado em um país desenvolvido onde, provavelmente, a probabilidade de ocorrência de reinfecção é reduzida, existe a possibilidade de que cepas resistentes aos fármacos 5-nitroimidazólicos possam estar sendo disseminadas na população.

O estudo sobre resistência aos fármacos 5-nitroimidazólicos ainda é realizado, preponderantemente, utilizando modelos *in vitro*. Há diversas formas de induzir resistência aos fármacos 5-nitroimidazólicos. No nosso estudo, foi utilizada a indução de resistência em *G. duodenalis* (cepa WBATCC50803) por exposição contínua ao metronidazol, por considerarmos que essa é a forma que mais se aproxima ao que, de fato, pode estar ocorrendo em populações que utilizam antimicrobianos de forma indiscriminada. No entanto, outros autores sugerem, além da exposição contínua, a exposição intermitente de *G. duodenalis* a essa classe de fármacos ou até mesmo a utilização de radiação ultravioleta seguido de exposição ao fármaco (Townson et al. 1992).

Para avaliar se ocorreu sucesso na obtenção de cepas resistentes aos fármacos 5-nitroimidazólicos, é necessário realizar uma análise da concentração do fármaco necessária para inibir 50% do crescimento parasitário ( $IC_{50}$ ). O aumento do valor de  $IC_{50}$  é um indicativo de menor susceptibilidade de determinado microrganismo a uma classe de fármaco.

Em nosso trabalho, para determinar a  $IC_{50}$  dos grupos experimentais, optamos pelo o método colorimétrico da resazurina devido à boa sensibilidade - limiar de detecção a partir de  $3 \times 10^4$  parasitos - facilidade de padronização e disponibilidade de reagentes e equipamentos. Ainda é possível realizar a determinação da  $IC_{50}$  por avaliação microscópica do crescimento (Upcroft & Upcroft 2001), inibição da aderência (Cruz et al. 2003), incorporação de timidina tritiada (Boreham et al. 1988), uso de sais de tetrazólio (Wright et al. 1992) e dosagem de ATP (Ansell et al. 2017).

O valor da  $IC_{50}$  dos dois grupos controles utilizados em nosso trabalho, SMTZ ( $IC_{50} = 2,26 \pm 0,3 \mu M$ ) e CDMSO ( $IC_{50} = 2,02 \pm 0,3 \mu M$ ), está de acordo com o valor obtido por Bénéré et al. 2007 para cepa susceptível de *G. duodenalis* do tipo WB ( $IC_{50} = 2,25 \pm 0,96 \mu M$ ), utilizando o método colorimétrico da resazurina. Um valor de  $IC_{50}$  de  $2,1 \mu M$  em cepa WB susceptível de *G. duodenalis* ao metronidazol foi encontrado em estudo utilizando dosagem de ATP como metodologia para avaliar a  $IC_{50}$  (Miyamoto & Eckmann 2015), corroborando nossos resultados da  $IC_{50}$ . Entretanto, já foi relatado um valor de  $IC_{50}$  que variou de  $7,79 - 9,39 \mu M$  utilizando dosagem de ATP em cepa WB de *G. duodenalis* susceptível ao metronidazol (Chen et al. 2011; Ansell et al. 2017).

Existem poucos estudos que avaliam os valores da  $IC_{50}$  após a exposição de *G. duodenalis* aos fármacos 5-nitroimidazólicos. Porém, um trabalho publicado recentemente, utilizando três cepas sensíveis: BRIS/83/HEPU/106 (referida como 106-s), BRIS/83/HEPU/703 (referida como 703-s) e WB-1B (referida como WB-s) e três cepas resistentes oriundas delas: BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub> (referida como 106-r), BRIS/83/HEPU/703-M3 (referida 703-r) e WB1B-M3 (referida como WB-r) (Ansell et al. 2017), traz essa informação. Embora esse estudo tenha como objetivo principal a análise do transcriptoma de cepas resistentes de *G. duodenalis*, alguns resultados do valor da  $IC_{50}$  de cepas sensíveis e resistentes podem ser comparados aos nossos, conforme pode ser confrontado abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3. Comparação entre os valores da IC<sub>50</sub> entre diferentes cepas de *Giardia duodenalis* expostas e não-expostas ao metronidazol**

Autor	Linhagem	Concentração em cultivo	Método de determinação do IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> fold change
Ansell et al. 2017	106-s	-	Dosagem de ATP	9,39 µM	2,55
	106-r	30 µM	Dosagem de ATP	23,99 µM	
	713-s	-	Dosagem de ATP	7,79 µM	5,43
	713-r	30 µM	Dosagem de ATP	42,33 µM	
	WB-s	-	Dosagem de ATP	8,28 µM	2,75
	WB-r	30 µM	Dosagem de ATP	22,79 µM	
	SMTZ	-	Colorimétrico (resazurina)	2,26 µM	-
	CDMSO	-	Colorimétrico (resazurina)	2,02 µM	2,01
	MTZ5	5 µM	Colorimétrico (resazurina)	4,03 µM	
	MTZ10	10 µM	Colorimétrico (resazurina)	5,07 µM	
	MTZ20	20 µM	Colorimétrico (resazurina)	7,09 µM	3,51

Observa-se que há uma diferença no valor da IC<sub>50</sub> quando comparamos nossa cepa e as utilizadas por Ansell et al. 2017. No entanto, o *fold change* da IC<sub>50</sub> é, na maioria das cepas, bastante próximo ao obtido pelo nosso estudo. É importante ressaltar que as cepas utilizadas por Ansell et al. 2017 foram cedidas por autores que induziram resistência nelas durante os anos de 1980, por diferentes estratégias, conforme será relatado abaixo.

A cepa BRIS/83/HEPU/106 (106-s) teve seu processo de indução de resistência realizado após 66 semanas de exposição de *G. duodenalis* a uma concentração de 4,96 µM de metronidazol. A determinação da IC<sub>50</sub> da cepa antes da exposição ao fármaco foi realizada utilizando como metodologia a análise da incorporação da timidina tritiada, tendo como resultado uma IC<sub>50</sub> de 0,86 µM de metronidazol. Já a cepa BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub> (106- r) apresentou uma IC<sub>50</sub> de 6,4 µM de metronidazol, com um *fold change* do valor da IC<sub>50</sub> igual a 7,44. De forma curiosa, a cepa resistente reverteu sua susceptibilidade ao metronidazol após 22 semanas em cultivo em meio de cultura sem o fármaco (Boreham et al. 1988).



A cepa WB1B (WB-s) e BRIS/83/HEPU/703 (703-s) apresentaram IC<sub>50</sub>, determinada por incorporação de timidina tritiada, de 1,15 µM e 0,85 µM, respectivamente. O método de indução de resistência envolveu a utilização de radiação ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) numa intensidade de 3,5 J/m<sup>2</sup>, seguido de um tempo de 48 horas para recuperação das células, e exposição a uma concentração de metronidazol 100 vezes maior do que o valor da IC<sub>50</sub> das cepas sensíveis. Portanto, a cepa WB1B-M3 (WB-r) era cultivada a 115 µM de metronidazol, enquanto que a cepa BRIS/83/HEPU/703-M3 (703-r) era cultivada a 85 µM de metronidazol. No entanto, devido ao lento crescimento dessas cepas em altas concentrações de metronidazol, a concentração de exposição foi diminuída em WB1B-M3 (WB-r) e BRIS/83/HEPU/703-M3 (703-r) para 62 µM e 42 µM, respectivamente (Townson et al. 1992). Nesse trabalho, a IC<sub>50</sub> após exposição ao metronidazol não foi determinada, dessa forma não conseguimos saber qual foi o *fold change* do valor da IC<sub>50</sub> entre as cepas resistentes e susceptíveis, pelo método da incorporação de timidina tritiada.

No nosso estudo, também obtivemos dificuldade na manutenção das células submetidas à elevada concentração de metronidazol; como no grupo MTZ80, submetido a 80 µM de metronidazol, concentração maior do que a encontrada no pico plasmático após o uso oral do metronidazol (50 - 70µM) (Upcroft & Upcroft 1993). Assim como no estudo de Townson et al. 1992, a exposição de nosso cultivo a elevadas concentrações de metronidazol levou a um crescimento vagaroso do parasito *in vitro*, inviabilizando a determinação do valor da IC<sub>50</sub>. Entretanto, apesar dessa limitação, a extração de DNA, a amplificação e sequenciamento dos fragmentos gênicos (*gdh*, *pfor* e *fd*) foram realizados, a fim de averiguar o impacto gerado pela exposição do parasito a elevadas concentrações de metronidazol a nível genômico.

Quando comparamos os valores da IC<sub>50</sub> dos nossos grupos experimentais e controle, os métodos utilizado para determinar a IC<sub>50</sub>, os métodos de indução de resistência e o tempo de exposição ao fármaco com os demais trabalhos observamos que há uma grande heterogeneidade entre os resultados, provavelmente resultante das diferentes metodologias e cepas empregadas.

No entanto, quando analisamos o *fold change* da IC<sub>50</sub> relativo ao metronidazol comparando as cepas suscetíveis e resistentes das diversas cepas de *G. duodenalis*, observamos que, com essa estratégia, os resultados até podem ser comparáveis, pois os valores de *fold change* do estudo de Ansell et al. 2017

variaram de 2,55 - 5,43, enquanto que o *fold change* da IC<sub>50</sub> dos nossos grupos experimentais variaram de 2,01- 3,51.

Apesar dos diferentes valores da IC<sub>50</sub> encontrados nos parasitos antes e após exposição ao metronidazol nos diferentes estudos, claramente foi demonstrado que a exposição prévia de *G. duodenalis* ao metronidazol, por determinado período de tempo, diminui a susceptibilidade do parasito ao fármaco *in vitro*. Quando consideramos que há uma utilização indiscriminada de fármacos antimicrobianos pela população, este achado levanta a hipótese de que a exposição constante de *G. duodenalis* aos fármacos utilizados em seu tratamento nos pacientes também possa levar a uma pressão seletiva no parasito. Além disso, formas resistentes que tenham sido selecionadas poderiam estar sendo disseminadas na população.

No nosso estudo, a exposição de trofozoítos de *G. duodenalis* ao metronidazol *in vitro* levou a uma diminuição da susceptibilidade do parasito ao fármaco. Considerando que o metronidazol é um pró-fármaco que precisa ser metabolizado por proteínas parasitárias, como o sistema piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR) / ferredoxina (FD), para exercer sua atividade biológica (Edward 1993), é razoável inferir que qualquer alteração nessas proteínas poderia diminuir a susceptibilidade do parasito ao fármaco.

Com o objetivo de avaliar os genes que participam da ativação do metronidazol, *primers* descritos na literatura para a região de ligação de grupamentos Fe-S de *pfor* e *fd* foram utilizados para averiguar se alterações nucleotídicas dessas regiões poderiam esclarecer a menor susceptibilidade de cepas axênica de *G. duodenalis* expostas ao metronidazol *in vitro*.

Alterações nucleotídicas na região de ligação dos grupamentos Fe-S da ferredoxina poderiam provocar mudanças na capacidade dessa proteína em realizar reações de oxidorredução e, conseqüentemente, causar impacto na capacidade de ativação do metronidazol. Entretanto, quando analisamos o fragmento gênico associado à região de ligação do grupamento 2Fe-2S da ferredoxina (*fd*), não foram observadas alterações nucleotídicas em nenhum dos grupos experimentais.

A avaliação capacidade da ferredoxina (FD) em promover a redução do metronidazol, extraída de três cepas susceptíveis (BRIS/87/HEPU/713, BRIS/83/HEPU/106 e WB1B) e de suas respectivas cepas resistentes (BRIS/87/HEPU/713-M3, BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub> e WB1B-M3), revelou que a capacidade de reduzir o metronidazol estava 2,2 vezes reduzida em BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub>, 2,6 vezes reduzida WB1B-M3 e 11,8 vezes reduzida em

BRIS/87/HEPU/713-M3, em relação a suas respectivas cepas susceptíveis. Esses resultados levantam a hipótese de que há uma diminuição da haloferredoxina em relação à apoferredoxina (sem o grupamento Fe-S) (Liu et al. 2000). Como os grupamentos Fe-S são importantes para a ocorrência de reações de oxidorredução, um aumento da apoferredoxina poderia explicar a menor capacidade da ferredoxina em promover reações de oxidorredução em cepas resistentes e, portanto, menor capacidade em converter o metronidazol a sua forma biologicamente ativa, diminuindo sua susceptibilidade ao metronidazol.

Um estudo utilizando imunofluorescência indireta, com anticorpos de camundongos produzidos contra a ferredoxina, demonstrou um decréscimo da ferredoxina no citosol das cepas resistentes ao metronidazol BRIS/87/HEPU/713-M3, BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub> e WB1B-M3 em relação as suas respectivas cepas susceptíveis, resultado que foi confirmado por Western Blot (Liu et al. 2000). Logo, o estudo de Liu et al. 2010 sugere uma provável participação da ferredoxina, pelo menos *in vitro*, como componente importante para o desenvolvimento de resistência de *G. duodenalis* ao metronidazol.

Assim como na ferredoxina, uma alteração genômica na região de ligação dos grupamentos Fe-S da piruvato-ferredoxina oxidorredutase poderia afetar consideravelmente a capacidade dessa proteína em realizar reações de oxidorredução. Entretanto, quando analisamos o fragmento gênico associado à região catalítica 3Fe-4S e 4Fe-4S de *pfor*, observamos que não houve alterações nucleotídicas em nenhum dos grupos expostos ao metronidazol.

De forma semelhante ao nosso estudo, Argüello-García et al. 2009 utilizando cepa WBRM23, cultivada na presença de 23 µM de metronidazol, e cepa WBRM21, cultivada na presença de 10µM de metronidazol, não encontraram alterações nucleotídicas no gene *pfor*. Contudo, ocorreu uma menor expressão do mRNA desse gene na cepa WBRM23 em relação ao controle, sugerindo que tal adaptação pode se dar ao nível de expressão gênica.

A enzima piruvato-ferredoxina oxidorredutase, codificada por *pfor*, atua na via glicolítica do parasito, convertendo piruvato em acetil-CoA (Adam 2001). A linhagem resistente de *G. duodenalis* da cepa WB-M1, gerada por meio de exposição à radiação ultravioleta seguida de exposição a 50µM de metronidazol, apresentou redução significativa da expressão do mRNA de *pfor* e menor consumo de glicose, provavelmente porque a menor expressão do mRNA de *pfor* deva ter afetado a via glicolítica do parasito, com relação à cepa susceptível WB. Tal cepa, resistente, não

conseguiu estabelecer infecção em camundongos, provavelmente devido a menor capacidade de adesão ao epitélio intestinal do hospedeiro (Tejman-Yarden et al. 2011).

Se a diminuição da expressão do mRNA de *pfor* já foi suficiente para diminuir sua capacidade de causar infecção em camundongos, podemos inferir que uma alteração nucleotídica no gene *pfor* poderia ter um custo ainda mais elevado no desempenho do parasito em causar infecção *in vivo* e até mesmo afetar sua sobrevivência *in vitro*, pois uma alteração que comprometesse de maneira permanente a capacidade de geração de ATP pela via glicolítica de *G. duodenalis* poderia ser uma desvantagem para o parasito.

O decréscimo da expressão gênica do mRNA de *pfor* observado *in vitro* pode ser uma das justificativas para a sobrevivência de *G. duodenalis* exposta a elevadas concentrações de metronidazol (Argüello-García et al. 2009). No entanto, já foi visto que a diminuição da expressão do mRNA de *pfor* também altera sua capacidade de infectividade *in vivo* (Tejman-Yarden et al. 2011). Esses fatos levantam a questão sobre se os achados obtidos *in vitro* podem ser translacionados para o que, de fato, ocorre nos pacientes, abrindo espaço para que novas hipóteses sejam formuladas, como o estudo de outros genes que indiretamente podem participar do processo de resistência de *G. duodenalis* aos fármacos 5-nitroimidazólicos.

O gene da glutamato desidrogenase (*gdh*) é bastante utilizado na genotipagem de *G. duodenalis*, assim como os genes da triose fosfato isomerase (*tpi*) e  $\beta$ -giardina ( $\beta$ -*gia*) (Feng & Xiao 2011, Faria et al. 2017b). Intrigantemente, o mRNA do gene *gdh* foi 59% menos expresso em parasitos que tiveram resistência induzida ao metronidazol *in vitro* (Müller et al. 2007), o que poderia torná-lo inadequado para servir como gene controle em estudos que analisam a expressão gênica em cepas resistentes (Müller et al. 2007, Ansell et al. 2015).

Um dos produtos da reação promovida pela enzima glutamato desidrogenase é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e essa coenzima pode ser utilizada por outras enzimas que atuam ativando o metronidazol na sua forma biologicamente ativa, como a tiorredoxina redutase. Dessa forma, apesar de não estar diretamente associada à via de ativação do fármaco, sua menor expressão ou atividade poderia diminuir a quantidade de NADPH celular, que pode ser utilizada como agente redutor em outras reações enzimáticas, inclusive as que ativam o metronidazol (Ansell et al. 2015).

Portanto, tendo em vista que o gene *gdh* poderia ter um papel importante no

processo de resistência *in vitro*, sequenciamos o gene *gdh* nos nossos grupos experimentais, a fim de analisar se poderia existir alguma alteração nucleotídica nesse gene. No entanto, nenhuma alteração nucleotídica foi encontrada entre os grupos experimentais.

Embora não tenhamos encontrado alterações nucleotídicas nos genes estudados, alterações na expressão gênica, na capacidade de promover redução do metronidazol e atividade enzimática foram encontradas em *gdh*, *pfor* e *fd* por outros autores (Müller et al. 2007, Argüello-García et al. 2009, Liu et al. 2000). Essas evidências apontam que o processo de resistência aos fármacos 5-nitroimidazólicos em *G. duodenalis* esteja relacionado à expressão gênica e proteica. Há também evidências de que concentração intracelular de coenzimas, como NADPH, e outras moléculas de baixo peso molecular, como a cisteína, possam estar envolvidas no processo de resistência *in vitro* (Ansell et al. 2015). Além disso, um estudo recente identificou a presença de bomba de efluxo de fármaco na cepa resistentes BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub>, a presença desse sistema pode diminuir ativamente a concentração do metronidazol no interior do parasito, o que pode possibilitar sua sobrevivência na presença de concentrações elevadas de metronidazol (Ansell et al. 2017).

No entanto, não se pode excluir a possibilidade de que alterações genômicas possam propiciar resistência de *G. duodenalis* ao metronidazol, já que a linhagem resistente BRIS/83/HEPU/106-2ID<sub>10</sub> apresentou um códon de parada prematuro em 29% dos transcritos da enzima nitrorredutase 1, uma das responsáveis pela reação de redução do metronidazol a seu composto biologicamente ativo. Esse códon de parada poderia ser oriundo de uma substituição de nucleotídeo único no DNA, com a troca de uma citosina por uma timina na posição 583 do gene da nitrorredutase 1 (Ansell et al. 2017).

Já que para se tornar a sua forma biologicamente ativa, os 5-nitroimidazóis são metabolizados por proteínas do próprio parasito, estudos genômico, transcriptômico, proteômico e metabolômico são necessários para elucidar qual (is) o(s) mecanismo(s) responsável (is) pela resistência do parasito *in vitro*. Como a persistência do parasitismo por *G. duodenalis* após o tratamento com fármacos 5-nitroimidazólicos vem se tornando um problema crescente, e a resistência do parasito a esses fármacos é uma das principais hipóteses (Carter et al. 2017), a elucidação dos mecanismos responsáveis pela falha terapêutica em amostras clínicas de fezes pode viabilizar o desenvolvimento de testes que permitam detectar

tal fenômeno, o que potencialmente trará um impacto no manejo da giardíase.

## 6 CONCLUSÕES

A exposição contínua *in vitro* de *G. duodenalis* ao metronidazol reduziu a susceptibilidade do parasito ao fármaco. Entretanto, este fenômeno não foi associado a alterações nucleotídicas nos genes *pfor*, *fd* e *gdh*, que vem sendo associados à resistência de *G. duodenalis* ao metronidazol, sugerindo que outros genes ou mesmo o comprometimento de vias metabólicas podem estar na gênese desse fenômeno.

## 7 PERSPECTIVAS

- Avaliar se a diminuição da susceptibilidade de cepas de *G. duodenalis* (WBC6ATCC50803) previamente expostas ao metronidazol *in vitro* tem caráter permanente.
- Investigar alterações na abundância proteica de vias metabólicas interligadas à ativação do metronidazol e de proteção contra agentes oxidantes em cepas de *G. duodenalis* (WBC6ATCC50803), visando identificar proteínas diferencialmente expressas entre parasitos expostos e não-expostos ao metronidazol.
- Investigar se as alterações encontradas na abundância proteica de vias metabólicas que promovem a resistência de *G. duodenalis* (WBC6ATCC50803) *in vitro* podem ser oriundas de alterações genômicas.
- Investigar se as alterações genômicas encontradas em cepas de *G. duodenalis* poderiam ser utilizadas para avaliação de resistência em amostras clínicas de fezes.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 3: 447-475
- Ansell BRE, McConville MJ, Ma'ayeh SY, Dagley MJ, Gasser RB, Svärd SG, Jey AR 2015. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv* 33: 888-901.
- Ansell BRE, Baker L, Emery SJ, McConville MJ, Svärd SG, Gasser AR, Jex AR 2017. Transcriptomics indicates active and passive metronidazole resistance mechanisms in three seminal *Giardia* lines. *Front Microbiol* 8 doi: 10.3389/fmicb.2017.00398.
- Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Orgeta-Pierres G 2009. *In vitro* resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. *Infect Genet Evol* 9: 1057-1064.
- Bassily S, Farid Z, Mikhail W, Kent DC, Lehman JS 1970. The treatment of *Giardia lamblia* infection with mecrapine, metronidazole and furazolidone. *J Trop Med Hyg* 73: 15-18.
- Bénére E, da Luz RA, Vermeersch M, Cos P, Maes L 2007. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trofozoites. *J Microbiol Methods* 2: 101-106.
- Boreham PFL, Phillips RE, Shepherd RW 1988. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1: 104-106.
- Brasil 2010. Ministério da saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ed. Brasília. 202-204.
- Brown, DM, Upcroft JA, Upcroft P 1996. A H<sub>2</sub>O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Eur J Biochem* 24: 155-161.

- Cacciò SM, Ryan U 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol* 160: 75-80.
- Cantey PT, Roy S, Lee B, Conquist A, Smith K, Liang J, Beach MJ 2011. Study of nonoutbreak: novel findings and implications for research. *Am J Med* 124: 1175.
- Carter ER, Nabarro LE, Hedley L, Chiodini PL 2017. Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions *Clin Microbiol Infec* 17 doi:10.106/j.cmi.2017.05.028.
- Charon MH, Volbeda A, Chabriere E, Pieulle L, Fontecilla-Camps JC 1999. Structure and electron transfer mechanism of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Curr Opin Struct Biol* 6: 663-669.
- Chen CZ, Kulakova L, Southall N, Marugan JJ, Galkin A, Austin CP, Herzberg O, Zheng 2011. High-throughput *Giardia lamblia* viability assay using bioluminescent ATP content measurements. *Antimicrob Agents Chemother* 2: 667-675.
- Coelho CM, Durigan M, Leal DAG, Schneider AB, Franco RMB, Singer SM 2017. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: systematic review of 20 years of publications. *PLoS Negl Trop Dis* 10 doi: 10.1371/journal.pntd.0006005.
- Cosar C, Julou L 1959. The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *Trichomonas vaginalis* infections. *Ann Inst Pasteur* 96: 238-241.
- Craft JC, Murphy T, Nelson D 1981. Furazolidone and quinacrine. Comparative study of therapy for giardiasis in children. *Am J Dis Child* 135: 164-166.
- Cruz A, Sousa MI, Azeredo Z, Leite F, Sousa JCF, Cabral M 2003. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother* 51: 1017-1020.

- Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K 2009. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 653-660.
- Diav-Citrin O, Shechtman S, Goitteiner T, Arnon J, Ornoy A 2001. Pregnancy outcomes after gestational exposure to metronidazole therapy: a prospective controlled cohort study. *Teratology* 63: 186-192.
- Dinsdag SA, Hunter N 2017. Metronidazole: na update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkx.351.
- Dobell C 1920. The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med* 13: 1-15.
- Eckmann L 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasites Immunol* 25: 259-270.
- Edwards DI 1993. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1: 9-20.
- Efstratiou A, Ongerth JE, Karanis P 2017. Waterborn transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks- an update 2011-2016. *Water Rev* 114: 14-22.
- Escobedo AA, Almirall P, Robertson LJ, Franco RMB, Hanevik K, Mørch K, Cimerman S 2010. Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease. *Infect Disord Drugs Targets* 5: 329-348.
- Ey PL, Bruderer T, Weshri C, Köhler P 1996. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol Res* 82: 52-60.
- Fantinatti M, Bello AB, Fernandes O, Da-Cruz AM 2016. Identification of *Giardia lamblia* assemblage E in human points to a new anthrozoonotic cycle. *J Infect Dis* 8: 1256-1259

- Farbey MD, Reynoldson JA, Thompson RC 1995. *In vitro* susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol* 25: 593-599.
- Faria CP, Zanini GM, Dias GS, Silva S, Freitas MB, Almendra R, Santana P, Souza MDC 2017a. Geospatial distribution of intestinal parasitic infection in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. *PLoS Negl Trop Dis* 3 doi: 10.1371/journal.pntd.0005445.
- Faria CP, Zanini GM, Dias GS, Silva S, Souza MDC 2017b. New locus genotypes of *Giardia lamblia* human isolates. *Infect Genet Evol* 54: 128-137.
- Farthing MJG 1996. Giardiasis. *Gastroenterol Clin North Am* 25: 493-515.
- Feng Y, Xiao L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 1: 110-140.
- Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* 54: 679-708.
- Garcia LS, Shimizu RY 1997. Evaluation of nine immunoassay Kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 35: 1526-1529.
- Gardner TB, Hill DR 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 1: 114-128.
- Halliez MCH, Buret A 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol* 47: 8974-8985.
- Hiatt RA, Markell EK, Ng E 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg* 53: 36-39.

- Hill DR 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infect Clin North Am* 7: 503-525.
- Hill DR, Nash TE. *Giardia lamblia*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Filadélfia. Elsevier; 2015. 3154-3160.
- Katiyar M, Visvesvara GS, Edlind TD 1995. Comparison of ribosomal RNA sequence of amitochondrial protozoan: implication for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 152: 27:33.
- Keister DB 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 487-488.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Bio Evol* 33:1870-1874.
- Lalle M 2010. Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infec Disord Drug Targets* 4: 283-294.
- Lambl W 1859. Mikroskopische untersuchungen der darm-excrete. *Vierteljahrsschr Prakst Heikunde* 26: 1-58
- Lamp KC, Freeman DC, Klutman NE, Lacy MK 1999. Pharmacokinetics and phamacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacoknet* 36: 353-373.
- Lane S, Lloyd D 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 28: 123–147.
- Lasek-Nelsselquist E, Welch DM, Sogin ML 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblages in marine vertebrates and a preliminary analysis of *Giardia duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 40: 1063-1074.

- Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC 1992. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin Pharmacokinet* 23: 328-364.
- Lemée V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, Favenecc L 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia lamblia* from France. *J Antimicrob Chemother* 46: 819-821.
- Leitsch D, Burgess AG, Dunn LA, Krauer KG, Tan K, Duchêne M, Upcroft P, Eckmann L, Upcroft JA 2011. Pyruvate:ferredoxin oxireductase and thioredox are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *J Antimicrob Chemother* 66: 1756-1765
- Lengerich EJ, Addiss DG, Juranek DD 1994. Severe giardiasis in the United States. *Clin Infect Dis* 5: 760-763.
- Liu SM, Brown DM, O'Donoghue P, Upcroft P, Upcroft JA 2000. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1: 137-140.
- Maeda K, Osato T, Umezawa H 1953. A new antibiotic, azomycin. *J Antibiot* 6: 182.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR 1997. Waterborn protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1: 67-85.
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology* 11: 11-17.
- McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM 2014. Detection of intestinal protozoan in clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 52: 712-720.
- Meyer EA, Jarrol EL 1980. Giardiasis. *Am J Epidemiol* 111: 1-12.

- Miljkovic V, Arsic B, Bojanic B, Nikolic L, Kalicanin B, Savic V 2004. Interactions of metronidazole with others medicines: a brief review. *Pharmazie* 69: 571-577.
- Mineno T, Avery MA 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Curr Pharm Des* 9: 841-855.
- Miyamoto Y, Eckmann L 2015. Drug development against the major diarrhea-causing parasites of the small intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Front Microbiol* 6 doi: 10.3389/fmicb.2015.01208.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL 1999. Molecular systematic of the parasite protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16: 1135-1144.
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackirill J, Kulda J, Isaac-Renton JL, Ey PL 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology* 116: 7-19.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RC 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25: 93-100.
- Moreno SNJ, Mason RP, Docampo R 1984. Distiction reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Tritrichomonas fetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *J Biol Chem* 259: 8252-8259.
- Mowatt MR, Luján HD, Cotton DB, Bowers B, Yee J, Nash TE, Stibbs HH 1995. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst protein gene. *Mol Microbiol* 15: 955-963.
- Müller J, Steck M, Hemphill A, Müller N 2007. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 2: 280-287.

- Nabarro LE, Lever RA, Armstrong M, Chiodini PL 2015. Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013. *Clin Microbiol Infect* 8: 791-796.
- Nagel JL, Aronoff DM . Metronidazole. *In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Filadélfia. Elsevier; 2015. 350-357.
- Nash TE 2001. Treatment of *Giardia lamblia* infections. *Pediatr Infect Dis* 20: 193-195.
- Nash TE, Ohi CA, Thomas E, Subramanian G, Keiser P, Moore TA 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin Infect Dis* 33: 22-28.
- Nillius D, Müller J, Müller N 2011. Nitroreductase (G1NR1) increases susceptibility of *Giardia lamblia* and *Escherichia coli* to nitro drugs. *J Antimicrob Chemother* 66: 1029-1035.
- Nixon JE, Wang A, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, Samuelson J 2002. A spliciosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad sci USA* 6: 3701-3705.
- Ortega YR, Adam RD 1997. *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis* 3: 545-549.
- Otto TD, Catanho M, Degrave W, de Miranda AB 2007. The PDTIS bioinformatics platform: from sequence to function. *RECIIS- Elet J Commun in Innov Health* 1: 286-294.
- Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, McCormick BJJ, McGrath M, Olortegui MP, Samie A, Shakoor S, Mondal D, Lima IFN, Hariraju D, Rayamajhi BB, Qureshi S, Kabir F, Yori PP, Mufamadi B, Amour C, Carreon JD, Richard SA, Lang D, Bessong P, Mduma E, Ahmed T, Lima AAAM, Mason CJ, Zaidi AKM, Bhutta ZA, Kosek M, Guerrant RL, Gottlieb M, Miller M, Kang G, Houpt ER 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health* 3: 564-575.



- Rendtorff RC 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 2: 209-220.
- Robert L, Zeibig E. Coleta e processamento de amostras. *In: Parasitologia Clínica: Uma Abordagem clínico Laboratorial*. Rio de Janeiro. Elsevier; 2014. 14-42.
- Rossignol JF, Maisonneuve H 1984. Nitazoxanida in the treatment of *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*. *Am J Trop Med Hyg* 33: 511-512.
- Rossignol JF 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol* 124: 45-53.
- Savioli L, Smith H, Thompson A 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends in Parasitol* 5: 203-208.
- Tejman-Yarden N, Eckman L 2011. New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr Opin Infect Dis* 24: 451–456.
- Tejman-Yarden N, Millman M, Lauwaet T, Davids BJ, Ginn FD, Dunn L, Upcroft JA, Miyamoto Y, Eckmann L 2011. Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia*. *Antimicrobiol Agents Chemother* 10: 4643-4651.
- Tellez A, Winiecka-Krusnell J, Paniagua M, Linder E 2003. Antibodies in mother’s milk protect children against giardiasis. *Scand J Infect Dis* 5: 322-325.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Thompson RC, Reynoldson JA, Mendis AH 1993. *Giardia* and Giardiasis. *Adv Parasitol* 32: 71-160.

- Thompson RC, Monis P 2012. *Giardia* - from genome to proteome. *Adv Parasitol* 78 : 57-95.
- Townson SM, Hanson GR, Upcroft JA, Upcroft P 1994. A purified ferredoxin from *Giardia lamblia*. *Eur J Biochem* 2: 439-446.
- Townson SM, Laqua H, Upcroft P, Boreham PFL, Upcroft JA 1992. Induction of metrodinazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 5: 521-522.
- Upcroft JA, Upcroft P 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol Today* 5: 187-190.
- Upcroft JA, Upcroft P 2001. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1810-1814.
- Volotão AC, Costa-macedo LM, Haddad FS, Brandão A, Peralta JM, Fernando O 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* from humans and animals samples using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop* 1: 10-19.
- Voogd CE 1981. On the mutagenicity of nitroimidazoles. *Mutat Res* 86: 247-277.
- Webster BH 1960. Furazolidone in the treatment of giardiasis. *Am J Dig Dis* 5: 618-622.
- Wolfe MS 1992. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 5: 93-100.
- Wright CW, Melwani SI, Phillipson JD, Warhurst DC 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 517-519.
- Wright JM, Dunn LA, Upcroft O, Upcroft JA 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2: 529-541.