

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção
do grau de Mestre.

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A599e Anjos, Karla Graziela Santana dos
Efeitos do dietilditiocarbamato em trofozoítos de *giardia lamblia*: uma nova
ferramenta na terapia contra a giardíase [manuscrito] / Karla Graziela Santana dos. -
2008.
59 f. : il. ; 30 cm.
Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório de Biomorfologia
Parasitária.
1. *Giardia Lamblia*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dietilditiocarbamato. T. I. Título.

CDU 616.995.132:615.32

AGRADECIMENTOS

Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Adriana Lanfredi Rangel

Primeiramente, pela amizade. Sua orientação na bancada foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho. Meu carinho por você é do tamanho do seu coração.

Msc. Cláudio Pereira Figueira

Pela amizade, incentivo e por muitas vezes me ajudar na hora do “sufoco”.

Glória Maria Maranhão Sweet

Por me acolher como uma mãe durante a realização deste trabalho. Sei que seremos eternas amigas!

Msc. Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Brandão

Pela amizade, companheirismo e apoio dado nos momentos difíceis.

Msc. Rafael Gomes, Diego Menezes e Alene Vanessa

Pelas discussões sobre estresse oxidativo e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Elizabeth Mota Costa

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

Elisângela Sodré

Pela amizade e excelente convivência.

Síntia Sacramento, Gustavo Miranda, Antônio Fávero e Edgard Neto

Aos giardólogos e amebólogos, pelo companheirismo e apoio durante todo este tempo na bancada.

Ana Lúcia Costa, Angélica Lacerda, Danielle Anjos, Daniel de Abreu Silva, Rafael Costa,

Thiara Monteiro, Samanta Alexandrino, Fernanda Bomfim e Lourdes Neta

Pela ótima convivência no laboratório.

Msc. Mateus Santos de Sá

Pelo apoio com o experimento de citotoxicidade em linfócitos.

Dr. Jorge Clarêncio

Pelo apoio dado na citometria de fluxo.

Taise Coutinho Caíres

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo suporte dado nas pesquisas.

Todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

Todos os professores e colegas do Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa de 2006

Pelos ensinamentos e amizade.

Todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Minha família (Carlos, Luiza e Vinícius) e meu noivo (Ricardo)

Por vocês existirem! Amo vocês, por inteiro!

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

*Aquilo que todos os dias seria limite para nós é destinado a se tornar grande como o olhar de
Nossa Senhora. Maria entendia que o conteúdo de cada condição humana desenvolve e
realiza o desígnio de um Outro: não o desígnio do próprio coração,
mas o do coração de Deus.*

*As dores, assim como a vida, certamente não lhes faltarão, mas vocês viverão a vida como um
caminho; mesmo quando o caminho for fatigante, será a descoberta de um bem realmente
grande.*

Luigi Giussani

RESUMO

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, onde é exposto a diferentes concentrações de oxigênio. Apesar do metabolismo fermentativo, trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio e mecanismos de detoxificação são requeridos. Desprovido de glutatona, *Giardia* expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína (CRP, também conhecidas como proteínas variantes de superfície ou VSP), como defesa antioxidante. Este mecanismo envolve ciclagem redox para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido e proteção contra o estresse oxidativo. Neste contexto, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem compreender uma poderosa estratégia quimioterápica contra a giardíase. Neste estudo, nós analisamos os efeitos do dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor de superóxido dismutase (SOD), na proliferação do parasito, expressão de tióis totais, lipoperoxidação, produção de radicais livres e arquitetura celular. DETC inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao metronidazol e induziu a peroxidação de membranas neste parasito, possivelmente pelo aumento de espécies reativas. Alterações ultraestruturais também foram observadas neste protozoário. Células tratadas com DETC apresentaram alto grau de extração citoplasmática, além de estruturas indicativas de autofagia. As vesículas periféricas também se encontravam maiores, sugerindo confluência. Estes efeitos são independentes de SOD, já que *Giardia* não apresenta esta enzima. Detecção de grupos tiol com a sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA) foram significativamente moduladas negativamente pelo DETC. Estes dados nos indicam que DETC aumenta o estresse oxidativo em trofozoítos de *Giardia lamblia* pela reação com grupos tiol.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, dietilditiocarbamato, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The microaerophilic protozoan *Giardia lamblia* inhabits the upper small intestine mucosa of vertebrate hosts, where it is exposed to different concentrations of oxygen. Despite the fermentative metabolism, *Giardia* trophozoites consume O₂ and produce oxygen free radicals and therefore mechanism for detoxification are required. Devoid of glutathione, *Giardia* express high concentrations of cystein-rich proteins (CRP, also known as variable surface protein or VSP), as an antioxidant defense. This mechanism involves redox cycling for maintenance of a reduced intracellular environment and protection from oxidative stress. In this regard, substances that interfere in the antioxidant response of this protozoan could comprise a powerful chemotherapeutic strategy for *Giardia lamblia* infection. Here, we analyzed the effects of DETC, a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, on parasite proliferation, thiol expression, lipid peroxidation, free radicals detection and cell architecture. DETC inhibited parasite proliferation at levels similar to metronidazole and induced peroxidation of membrane, possibly by the increase of reactive species. Ultrastructural alteration were also observed. Since this protozoan is devoid of SOD, here present data indicate SOD-independ DETC effects. Thiol groups detection with the fluorescent probe *o*-phthaldialdehyde (OPA). Cells treated with DETC displayed washed out cytoplasm and structures indicative of autophagy. The peripheral vesicles also had an increased volume, presumably caused by homophilic fusion. Taken together these data indicate that DETC enhance the oxidative stress in *Giardia* trophozoites by reacting with thiol groups.

Keywords: Giardia lamblia, diethyldithiocarbamate, oxidative stress.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	05
Figura 2	Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	06
Figura 3	Trofozoíto de <i>Giardia</i> em seção transversal.....	09
Figura 4	Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.....	24
Figura 5	Avaliação do possível sinérgico do DETC e metronidazol em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	25
Figura 6	Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.....	27
Figura 7	Análise da expressão de tióis livres em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8	Quantificação dos grupos sulfidríla em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Figura 9	Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia</i> em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 10	Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	32
Figura 11	Microscopia de fluorescência (A, C, E) e contraste de fase (B, D, F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 12	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	36
Figura 13	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> tratados com DETC.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Ceará
CO ₂	Dióxido de carbono
CRPs	Proteínas ricas em cisteína
Cu	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT-diaforase	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
DTNB	5,5'- ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico)
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ DCFDA	5'- (6')- carboxi, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulina A
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Me	Grupamento metil
Mtz	Metronidazol
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
S	Enxofre

SH	Grupo sulfidrina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido dismutase
SP	São Paulo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VSPs	Proteínas variantes de superfície
<i>Zn</i>	<i>Zinco</i>

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A giardíase.....	01
1.2. A giardíase no Brasil.....	02
1.3. Ciclo biológico.....	03
1.4. O trofozoíto.....	07
1.5. Mecanismos de detoxificação de espécies reativas em <i>Giardia</i>	10
1.6. Tratamento da giardíase.....	11
1.6.1. Nitroimidazóis.....	11
1.6.2. Quinacrina.....	13
1.6.3. Furazolidona.....	14
1.6.4. Benzimidazóis.....	14
1.6.5. Paromicina.....	15
1.6.6. Nitazoxanida.....	15
1.6.7. Bacitracina complexada a sais de zinco.....	16
1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas.....	16
1.7. Dissulfiram: novos potenciais terapêuticos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19

3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	20
4.3. Ensaio de inibição.....	20
4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	20
4.5. Detecção de tióis totais.....	21
4.6. Lipoperoxidação.....	21
4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas.....	21
4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol.....	22
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	22
4.10. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	23
5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	25
5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i>	26
5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	28
5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC.....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GIARDÍASE

A Giardíase é uma enteroparasitose causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Espécies deste gênero infestam mais de 40 espécies de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2002; Appelbee *et al.*, 2005), que podem agir como reservatório para cepas patogênicas em humanos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma cística infectante que pode sobreviver no ambiente por meses e a trofozoíta, que prolifera intensamente na porção anterior do intestino (Adam, 2001). As manifestações clínicas da doença são diarreia aguda ou crônica (eventualmente esteatorréia), desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller & Von Allmen, 2005; Gascón, 2006). Artrite reativa também tem sido associada com infestações entéricas por *Giardia lamblia* (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), bem como o status nutricional afetando função cognitiva e desenvolvimento escolar em crianças pela prevalência de doenças infecciosas intestinais (Olness, 2003).

A distribuição da giardíase é mundial, sendo a parasitose intestinal mais comum em países desenvolvidos, com taxas de detecção entre 2-5% e, 20-30% em nações em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 1996 que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tinham sintomas de giardíase com cerca de 500.000 novos casos por ano, especialmente entre crianças. Em 2004, a giardíase foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido a sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarreicas (OMS, 2002).

Atualmente as infecções por *G. lamblia* são controladas por drogas, sendo as mais efetivas as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 1998). Casos de resistência clínica são relatados na literatura (Townson, 1994; Farthing, 1996), com taxas de recorrência acima de 90% (Zaat *et al.*, 1997). Além disso, o metronidazol exhibe potencial carcinogênico para humanos (Bendesky *et al.*,

2002). Desta forma, a identificação de novas vias parasito-específicas e desenvolvimento de novas drogas é necessário para o tratamento da giardíase.

No lúmen intestinal do hospedeiro vertebrado, *Giardia* é exposta a diferentes concentrações de oxigênio (Biagini *et al.*, 2001). Apesar do metabolismo fermentativo, *Giardia* consome O₂, produzindo radicais livres de oxigênio e a resposta imune também pode usar espécies oxidativas (Fernandes & Assreuy, 1997). Desta forma, mecanismos de detoxificação são requeridos (Brown *et al.*, 1995). Trofozoítos de *Giardia* são cobertos por proteínas ricas em cisteína (CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície), envolvidas na proteção do parasito contra os efeitos letais do oxigênio (Mehlotra & Tekwani, 1999). Além disso, estas proteínas estão associadas à resistência a proteases e à variação antigênica, sendo identificados cerca de 150 genes diferentes que codificam para as CRPs em *G. lamblia* (Nash, 2002). A enzima dissulfeto redutase está presente em *Giardia*, conferindo um balanço redox dissulfeto intracelular, ressaltando a importância da cisteína neste parasito na resposta ao estresse oxidativo. A cisteína é descrita como um fator de crescimento essencial para a *Giardia*, o que pode ser verificado no cultivo axênico (Luján & Nash, 1994; Mehlotra & Tekwani, 1999). Nesse sentido, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem constituir uma poderosa estratégia quimioterápica no parasitismo por *Giardia lamblia*.

1.2. A GIARDÍASE NO BRASIL

No Brasil, sua ocorrência é em grande parte desconhecida - principalmente em adultos. Prevalências relatadas de giardíase em crianças brasileiras variam de 14,6% em populações específicas a 78,3% em creches e crianças em idade escolar (Machado & Costa-Cruz, 1998; da Costa-Macedo *et al.*, 1998; Orlandi *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo sobre a giardíase foi realizado em Gonçalves Dias no município de Fortaleza (CE), acompanhando crianças recém-nascidas até os 4 anos de idade (Newman *et al.*, 2001). Dentre as 157 crianças, 43 (27,4%) encontravam-se infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 46% apresentaram recorrências ou recidivas. As crianças que apresentavam sintomas tiveram valores reduzidos de peso e altura, quando avaliados física e nutricionalmente.

No Hospital da Universidade Federal da Bahia, foi realizado um estudo detalhado sobre a prevalência de parasitos intestinais em 365 pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Cerca de 4,9% destes pacientes apresentaram infestação por *Giardia lamblia*, demonstrando uma prevalência significativamente aumentada quando comparada ao grupo que não apresentava a SIDA (2,4%). O grupo controle foi composto por 5243 pacientes (Feitosa *et al.*, 2001).

Machado *et al.* (1999), em um estudo sobre a incidência de giardíase em crianças de creches e escolas de ensino fundamental e médio, no município de Mirassol (SP), confirmam os dados obtidos por outros autores (Wolfe, 1978; Cardoso *et al.*, 1995; Guimarães & Sogayar, 1995) que tanto a idade (2 a 6 anos) quanto o nível sócio-econômico (até 6 salários mínimos) são fatores de risco determinantes da giardíase. Isto se dá pelo fato do nível sócio-econômico e grau de escolaridade mais baixos influenciarem as condições de higiene pessoal e cuidados com alimentos e água (Machado *et al.*, 1999). Um estudo prospectivo de doenças diarréicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para aquisição de giardíase (Guerrant *et al.*, 1983).

Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) demonstraram haver associação entre má nutrição (desnutrição energético-protéica) e o parasitismo por *Giardia lamblia* através da observação de redução significativa dos valores de peso em relação à idade e altura. Outros estudos demonstraram a relação entre infestações por *Giardia* e subnutrição na África (Loewenson *et al.*, 1986) e Ásia (Al-mekhlafi *et al.*, 2005). Ertan *et al.* (2002) também encontraram associação entre baixos níveis séricos de ferro e zinco e a giardíase.

O decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasito (Wolfe, 1978; Hill, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1999) e também com a melhoria dos hábitos de higiene pessoal associada ao aumento da idade.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

A infestação por *Giardia* ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados por fezes contendo cistos (Fig. 1), como ocorre freqüentemente em creches e

orfanatos onde as condições de higiene podem estar comprometidas (Thompson, 2004). O encistamento ocorre no trato digestório, auxiliado pelo baixo pH e proteases estomacais (Adam, 2001), dando origem ao excizoíto (Bernander *et al.*, 2001). O excizoíto é oval, possui oito flagelos, quatro núcleos e metabolismo intermediário entre o trofozoíto e o cisto (Fig. 2). Possui uma ploidia total de 16N, sofrendo divisão celular por duas vezes sem replicação do DNA, gerando quatro trofozoítos com uma ploidia de 4N (Bernander *et al.*, 2001). Estes últimos irão se dividir por fissão binária e a adesão ao epitélio intestinal se dá através do disco ventral (Elmendorf *et al.*, 2003).

O encistamento ocorre com a passagem dos trofozoítos pelo lúmen intestinal, onde eles se soltam e são expostos na região posterior do intestino a um pH mais alcalino (em torno de 7,8), ácidos graxos e sais biliares (Gillin *et al.*, 1988). A ausência de lipoproteínas também demonstrou ser um fator de promoção do encistamento, o que pôde ser revertido pela adição de colesterol (Luján *et al.*, 1996).

O processo de formação da parede cística envolve a ativação dos genes de encistamento em resposta a estímulos e posterior síntese de proteínas que constituirão a parede cística (Lujan *et al.*, 1995a; 1997), as quais são transportadas para a membrana plasmática através das vesículas específicas de encistamento (ESVs) (Reiner *et al.*, 1990; Benchimol, 2004). Durante o tráfego destas proteínas, é provável que haja a participação das vesículas periféricas na maturação do material a ser secretado (Touz *et al.*, 2002a).

O potencial zoonótico desta doença tem sido considerado na literatura como um fator de relevância na transmissão peridomiciliar de felídeos e canídeos (Thompson, 2000).

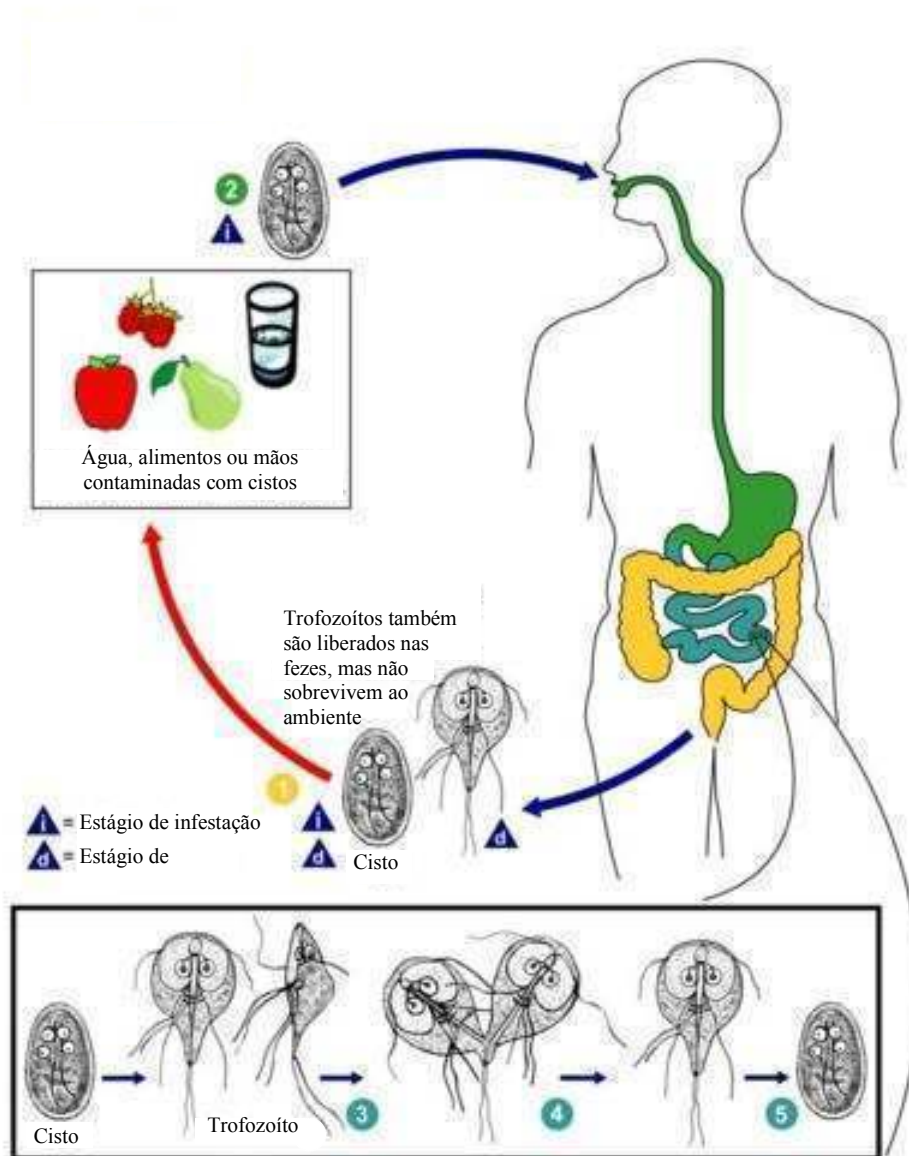


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Cistos e trofozoítos eliminados através das fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Trofozoítos em processo de divisão. (5) Encistamento. Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc-gif>.

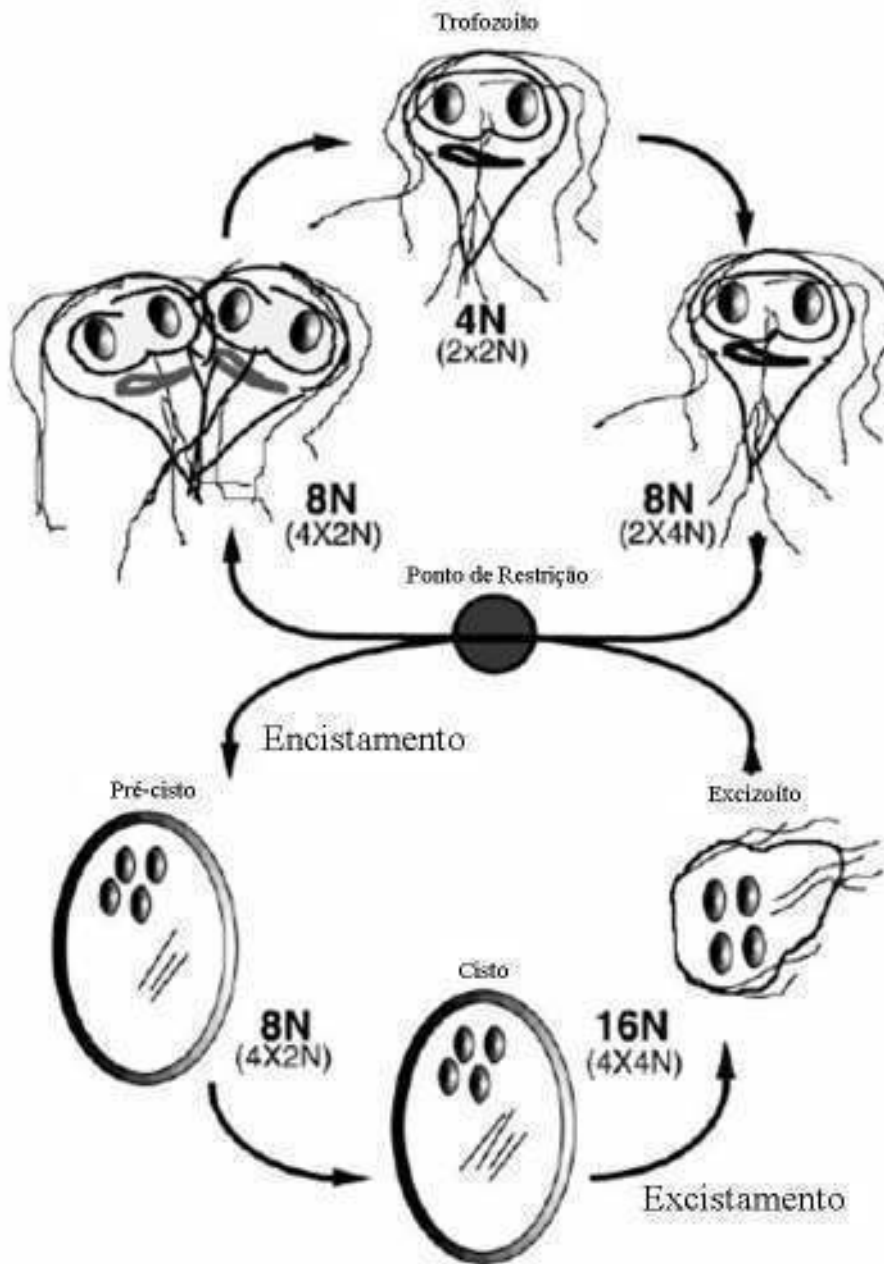


Figura 2. Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Durante o crescimento vegetativo, a ploidia varia entre 4N e 8N. Após a estimulação do encistamento e concomitante formação da parede cística, o núcleo se divide, resultando em uma célula tetranucleada com ploidia de 8N. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros, com uma ploidia celular de 16N. O excistamento resulta na liberação de um excizoíto, que se divide duas vezes para formar quatro trofozoítos, contendo cada um dois núcleos diplóides. Adaptado de Bernander *et al.*, 2001.

1.4. O TROFOZOÍTO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* são piriformes, possuindo cerca de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, látero-posterior, caudal e ventral), sendo que os axonemas caudais são acompanhados pelo corpo funis e um disco adesivo é responsável pela adesão do trofozoíto às microvilosidades intestinais (Fig.3). Possui dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente e simétricos ao eixo longitudinal (Revisto por Adam, 2001). Ribossomos e grânulos de glicogênio se apresentam por todo o citoplasma e o retículo endoplasmático se projeta da região perinuclear até a região das vesículas periféricas, na região dorsal da célula (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). O complexo de Golgi torna-se visível em trofozoítos em processo de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999), mas não tem sido confirmada a presença em trofozoítos vegetativos (Gillin *et al.*, 1996). Apesar disso, mecanismos de transporte de proteínas estão presentes em *Giardia*, semelhantes aos que ocorrem na rede *trans* do aparelho de Golgi na maioria das células complexas (Gu *et al.*, 2001). Algumas evidências sugerem que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar organela(s) com função típica de Golgi, apesar de não ter sua aparência. NBD-ceramida, um marcador do complexo de Golgi em células de mamíferos, marcou uma estrutura perinuclear tanto em trofozoítos vegetativos, quanto em células em processo de encistamento (Luján *et al.*, 1995b; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

As vesículas periféricas são caracterizadas pela acidez dos seus compartimentos, como demonstrado através da incorporação de laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), bem como pela concentração de ferritina exógena e lucifer yellow, sugerindo seu papel na endocitose (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Os vacúolos contêm uma variedade de enzimas com atividade hidrolásica, como por exemplo, a fosfatase ácida, proteases e RNase, indicando suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). É provável que ocorra maturação destes vacúolos de endossoma inicial, tardio até lisossomo, processo que pode estar funcionalmente associado ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Apesar de *Giardia* não possuir mitocôndria, a presença de membranas especializadas com função transportadora de elétrons tem sido detectada (Lloyd *et al.*, 2002). Conhecidas como mitossomos, estas organelas são responsáveis pela produção de H₂ e apresentam maquinaria protéica para biossíntese de centros Fe-S (Tachezy *et al.*, 2001). Em eucariotos, este processo

ocorre exclusivamente em organelas limitadas por dupla membrana, como mitocôndria (Lill & Kispal, 2000), hidrogenossomos (Sutak *et al.*, 2004) e cloroplastos (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Peroxissomos, que são organelas citoplasmáticas responsáveis por reações oxidativas, estão ausentes neste parasito.

Os proteassomos de *Giardia* apresentam muitas similaridades com os de Archaea (Emmerlich *et al.*, 1999). Além disso, proteínas alvo de proteassomos são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar presente neste protozoário como um gene de cópia única, o que o distingue dos outros eucariotos, que possuem múltiplas cópias desse gene (Emmerlich *et al.*, 2001).

Cerca de 30% dos trofozoítos apresentam uma protrusão ventral que emerge da região central do disco adesivo. A observação desta estrutura revelou a presença de cisternas de retículo endoplasmático, muitas vezes formando membranas concêntricas envolvendo quantidades variadas de grânulos de glicogênio, possivelmente em processo de degradação, além de vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

A flange ventrolateral é uma projeção citoplasmática maleável, semelhante a lamelipódios, localizada entre as regiões de superfície ventral e dorsal e que se ajusta as microvilosidades das células epiteliais durante a adesão (revisto por Adam, 2001).

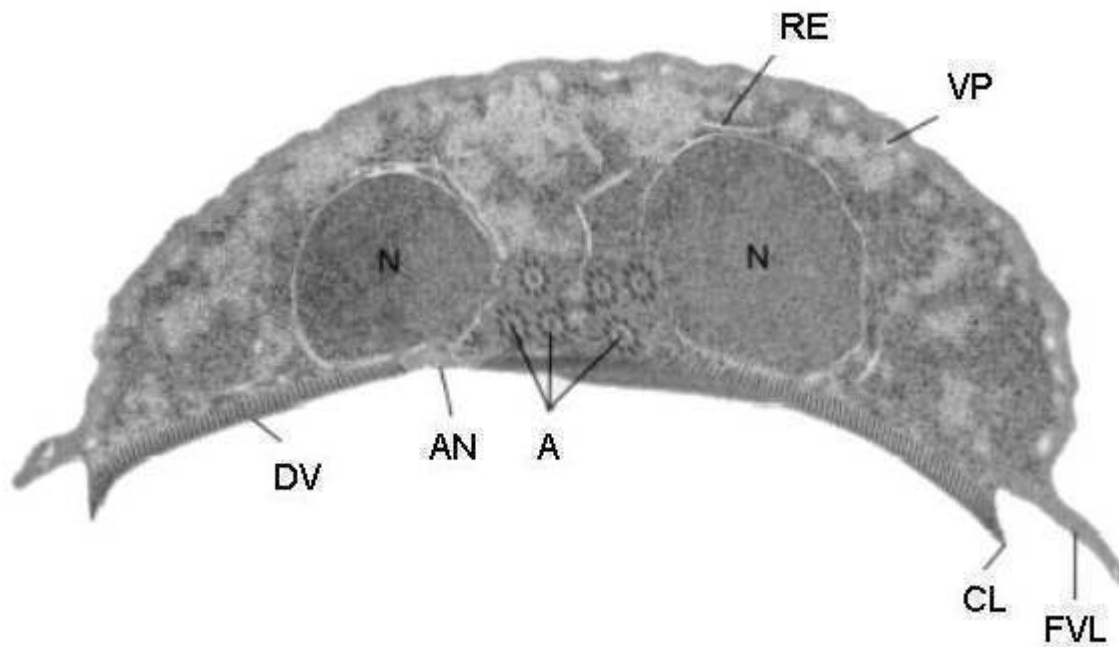


Figura 3. Trofozoíto de *Giardia* em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Adaptado de Adam, 2001.

1.5. MECANISMOS DE DETOXIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM *Giardia*

Apesar de não possuir mitocôndria, *Giardia* consome oxigênio e os produtos finais do seu metabolismo de glicose são sensíveis às tensões de O₂ presentes no lúmen intestinal. Em um ambiente anaeróbico, etanol, alanina e dióxido de carbono (CO₂) são formados em concentrações equimolares. Contudo, quando o oxigênio é introduzido, o balanço de carbono é radicalmente alterado. A produção de alanina é reduzida em cerca de 90% e a produção de acetato é simultaneamente aumentada em cerca de dez vezes. A concentração de CO₂ é aproximadamente duas vezes aumentada, mas a produção de etanol não é alterada (Paget *et al.*, 1990). A capacidade de respirar de alguns protozoários anaeróbicos sugere que eles são capazes de transferir elétrons ao oxigênio como seu acceptor final. Contudo, seu metabolismo permanece fermentativo, mesmo em condições aeróbicas. A utilização de O₂ por *Giardia lamblia* não é afetada por inibidores de respiração mitocondrial, mas bloqueada por flavo-antagonistas, inibidores de tiol e quelantes de metal (Weinbach *et al.*, 1980), sugerindo que algumas das flavoproteínas, tioproteínas e metaloproteínas podem usar O₂ como acceptor de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio neste parasito.

Os mecanismos de detoxificação de espécies oxidativas neste parasito incluem a atividade citoplasmática de uma oxidase flavina-dependente (NADH oxidase), que reduz tetravalentemente O₂ em H₂O, além de estar envolvida em mecanismos de resistência ao metronidazol de algumas cepas, que expressam altos níveis de atividade desta enzima (Ellis *et al.*, 1993). A susceptibilidade de *Giardia lamblia* ao oxigênio também é justificada pela presença da DT-diaforase, uma enzima que tem sua atividade acompanhada pelo aumento intracelular de peróxido de hidrogênio (Li & Wang, 2006). A NADH peroxidase, localizada na região transmembrana de *Giardia lamblia*, catalisa a formação de água a partir de peróxidos (Brown *et al.*, 1995).

Um importante mecanismo de proteção contra o ambiente hostil ao qual *Giardia* é submetido no intestino está relacionado a um ambiente redutor produzido pelas CRPs, que apresentam de 11 a 12% de cisteína e são expressas em *Giardia lamblia* em concentrações milimolares (Luján & Nash, 1994). A cisteína é o principal tiol de baixo peso molecular neste parasito, mas baixos níveis de sulfito, ácido tioglicólico e coenzima A também foram observados, enquanto que glutatona e seus intermediários não foram detectados (Brown *et al.*, 1993). Além disso, subsequente identificação de uma dissulfeto redutase (semelhante à tioredoxina redutase),

que utiliza cistina como aceptor primário de elétrons em *Giardia*, parece ser o maior sistema de atividade redox tiol-dissulfeto contra o estresse oxidativo neste protozoário (Brown *et al.*, 1996b). Pesquisas em dados de base genômicas em *G. lamblia* revelaram também homólogos de tioredoxinas peroxidases que, se expressadas, podem proteger organismos dos radicais livres de oxigênio pela redução de peróxidos com os elétrons da tioredoxina (Wood *et al.*, 2003).

Algumas das enzimas reconhecidamente envolvidas na detoxificação de radicais livres de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água pela catalase, não estão presentes em *Giardia*, sugerindo a importância dos grupamentos tiol na sobrevivência deste parasito (Brown *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Biagini e colaboradores (2001) descreveram o potencial antioxidante do piruvato em *Giardia*, transformando não enzimaticamente superóxido e peróxido de hidrogênio em acetato e CO₂.

Uma importante estratégia do parasito *G. lamblia* contra a defesa do hospedeiro durante a colonização da mucosa intestinal se dá através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase epitelial, por uma competição pela arginina, utilizada como fonte de energia pelo parasito. O NO apresenta propriedades citostáticas contra *Giardia* e o bloqueio de sua produção, conseqüentemente, permitirá a sua proliferação (Eckmann *et al.*, 2000).

Morte de trofozoítos de *Giardia lamblia* por macrófagos murinos ativados ocorreu rapidamente *in vitro* (Fernandes & Asseruy, 1997), com 60% dos parasitos sendo eliminados em cerca de 2 horas. Um inibidor de NO sintase, *N*-iminoetil-1-ornitina, protegeu os organismos. A extrema sensibilidade deste parasito ao estresse nitrosativo é principalmente devida à interrupção de funções da membrana plasmática, e perda da capacidade do consumo de O₂ em associação com a diminuição da atividade flagelar (Lloyd *et al.*, 2003).

1.6. TRATAMENTO DA GIARDÍASE

1.6.1. Nitroimidazóis

Os agentes da classe dos nitroimidazóis utilizados para tratamento de infecções por *Giardia* incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. O metronidazol foi primeiramente relatado para o tratamento da tricomoníase (Durel *et al.*, 1960), sendo posteriormente indicado para uso terapêutico na giardíase (Darbon *et al.*, 1962). Desde então, a síntese e testes biológicos de outros compostos nitroimidazóis têm sido uma crescente, aumentando o arsenal terapêutico contra protozoários e bactérias anaeróbicas (Scully, 1988; Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 2001a; Harder, 2002). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (Raether & Hänel, 2003).

Dos nitroimidazóis, o mecanismo de ação do metronidazol tem sido o mais amplamente estudado. A ativação da droga se dá através da redução do seu grupo nitro pela piruvato: ferredoxina oxidoredutase (Townson *et al.*, 1994; Samuelson, 1999), e um gradiente favorecendo o transporte intracelular do metronidazol é estabelecido por esta reação de redução. A atividade antimicrobiana deste composto reduzido resulta da reatividade e dismutação de intermediários instáveis, que matam os trofozoítos através da interação com várias moléculas essenciais como o RNA, DNA, proteínas e componentes de membrana, resultando em danos celulares irreversíveis (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988; Freeman *et al.*, 1997). Além destes efeitos, o metronidazol inibe o consumo de O₂ do trofozoíto, por agir como um aceptor de elétrons alternativo (Paget *et al.*, 1989). Apesar de este composto ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, ele se mostra ineficaz contra os cistos, provavelmente pela dificuldade em ultrapassar a barreira imposta pela parede cística (Thompson *et al.*, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do metronidazol incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (Levi *et al.*, 1977; Kavousi, 1979). Além disso, a inibição da aldeído desidrogenase por esta droga pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), pela ingestão de álcool durante o período de tratamento (Gardner & Hill, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos em altas doses por longos períodos tem sido relatado na literatura (Lindmark & Muller, 1976; Voogd, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (Bendesky *et al.*, 2002). O uso prolongado deste fármaco, falhas no tratamento e má conduta terapêutica tem aumentado os níveis de resistência clínica em pacientes parasitados por *Giardia lamblia*. Na França, mais de

20% dos casos de giardíase apresentam algum grau de resistência à droga (Lemeé *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001b).

Evidências clínicas em adultos e pacientes pediátricos têm demonstrado a eficácia e segurança do tinidazol no tratamento contra a giardíase, podendo ser usado em casos onde houve falhas no tratamento com o metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007). Apesar dos efeitos adversos relatados pelo uso deste fármaco, a exemplo de gosto amargo na boca, vertigem e perturbações intestinais, estes não são tão comuns como os causados pela utilização do metronidazol (Jokipii & Jokipii, 1979; 1982).

Um outro derivado dos 5-nitroimidazóis que é uma boa alternativa para o tratamento da giardíase é o ornidazol. Apesar dos poucos estudos realizados, este fármaco apresenta uma excelente eficácia, comparável ao tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1982; Bassily *et al.*, 1987; Kuzmicki & Jeske, 1994). Em um estudo *in vitro*, efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pelo ornidazol em culturas de sangue periférico humano foram sugeridos (López *et al.*, 2003). Apesar disso, efeitos colaterais raramente ocorrem em pacientes que fazem uso deste fármaco via oral (Escobedo & Cimerman, 2007).

O secnidazol também apresenta uma boa eficácia contra a giardíase, sendo rápida e completamente absorvido por via oral. Assim como o tinidazol e o ornidazol, este composto apresenta uma meia-vida longa (17-29 horas), o que permite a administração em dose única com concomitante diminuição dos efeitos colaterais em relação ao metronidazol (Gillis & Wiseman, 1996). Efeitos adversos têm sido relatados, a maioria notavelmente relacionada a distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.2. Quinacrina

A quinacrina é um derivado de acridina que foi primeiro introduzido como agente antimalárico em 1930. Somente em 1937 a eficácia deste composto foi demonstrada contra *Giardia*. Por muitos anos a quinacrina foi a droga de escolha no tratamento da giardíase, sendo substituída na década de 60 pelo metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação deste fármaco no parasito não está completamente elucidado. A diminuição do consumo de oxigênio pela interferência com componentes flavina de enzimas

como a NADH oxidase (Paget *et al.*, 1989) e inibição da síntese de ácidos nucléicos pela ligação ao DNA (Rivas *et al.*, 2000) são proposições feitas para o modo de ação desta droga. Após administração oral, a quinacrina é totalmente absorvida pelo trato intestinal, mesmo em pacientes com diarreia severa. Sua meia-vida é longa, sendo vagarosamente excretado pelos tecidos.

A toxicidade seletiva da quinacrina se deve ao fato de que a taxa de incorporação da droga no parasito é maior do que nas células do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). Este fármaco é eficaz contra cistos e também promove a redução do excistamento *in vitro*. Resistência induzida em culturas por quinacrina tem sido demonstrada, estando relacionada a uma diminuição da taxa de incorporação desta droga pelo protozoário (Upcroft *et al.*, 1996).

Efeitos colaterais deste fármaco incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, gosto amargo na boca e coloração amarelada ou alaranjada na pele e urina (Harris *et al.*, 2001). Outros efeitos relatados são hemólise em pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, psicose tóxica e exacerbação da psoríase (Gardner & Hill, 2001).

1.6.3. Furazolidona

Este derivado de nitrofurano foi descoberto em 1940, mas só em 1960 foi relatada sua atividade contra *Giardia lamblia* (Webster, 1960). Sua eficácia é menor do que a do metronidazol e quinacrina, porém sua grande vantagem consiste em sua formulação líquida, o que facilita a administração desta droga, principalmente em crianças (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação da furazolidona consiste na redução do seu grupo nitro pela NADH oxidase, cujos radicais citotóxicos causam danos aos componentes celulares, incluindo o DNA (Brown *et al.*, 1996a). Resistência está relacionada à diminuição das taxas de incorporação da droga pelo parasito e aumento dos níveis de enzimas com ciclagem tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. Podem também ocorrer reações semelhantes às causadas pelo dissulfiram após ingestão de álcool (Gardner & Hill, 2001). Efeitos mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura decorrentes do uso da furazolidona (Raipulis *et al.*, 2005).

1.6.4 Benzimidazóis

Inicialmente reconhecidos como drogas antihelmínticas, os benzimidazóis possuem um amplo espectro de ação, inclusive contra alguns protozoários (Escobedo & Cimerman, 2007). Dois membros dessa classe são utilizados no tratamento da giardíase, o albendazol e o mebendazol. Eles exercem seus efeitos pela ligação à β -tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e falhas na incorporação de glicose também ocorrem (Gardner & Hill, 2001). Cacopardo *et al.* (1995) demonstraram que a combinação albendazol-metronidazol foi 100% eficaz em portadores de *G. lamblia* resistente ao metronidazol. Uma outra vantagem relacionada ao uso do albendazol é a relativa falta de efeitos colaterais. A OMS recomenda que mulheres em período gestacional só recebam tratamento com albendazol e mebendazol a partir do terceiro mês de gestação (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.5. Paromicina

A paromicina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem sido uma alternativa eficaz e menos tóxica para gestantes infectadas por *Giardia* e em caso de cepas resistentes (Hill, 1993). O mecanismo de ação proposto para este fármaco é através da inibição da síntese protéica, interferindo nas subunidades ribossomais do parasito, que possuem tamanhos e seqüências incomuns (Katiyar *et al.*, 1994).

Após administração oral, pouco da droga é absorvida pela circulação sistêmica, atingindo altas concentrações no intestino. A maior parte da paromicina é excretada nas fezes. Em pessoas com disfunção nos rins, este fármaco pode se acumular e causar toxicidade renal (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.6. Nitazoxanida

A nitazoxanida é um 5-nitrotiazol que possui amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias, protozoários e helmintos. Estudos clínicos e *in vitro* têm confirmado a eficácia da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, no tratamento da giardíase. O mecanismo de ação é semelhante à classe dos 5-nitroimidazóis, através do grupo nitro (Adagu *et al.*, 2002). A absorção e bioviabilidade desta droga são aumentadas pela administração conjunta com alimentos (Stockis *et al.*, 2002). Uma vez fracamente absorvido pelo trato gastrointestinal, dois terços deste fármaco são expelidos pelas fezes e um terço pela urina (Broekhuysen *et al.*, 2000). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais.

1.6.7 Bacitracina complexada a sais de zinco

Este fármaco é composto de dois agentes: a bacitracina, um antibiótico produzido pela cepa Tracy-1 de *Bacillus subtilis*, e zinco, que promove estabilidade a este composto. Efeitos colaterais da bacitracina complexada a sais de zinco foram notados somente em um pequeno número de pacientes e incluem diarreia, náusea e desconforto abdominal. O uso prolongado desta droga causa problemas nefrotóxicos e distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas

O emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inapropriadas, os baixos custos e a facilidade de obtenção de determinados fármacos têm ocasionado resistência e feito com que em muitas partes do mundo, drogas como a cloroquina, penicilina e a meticilina sejam novamente utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Upcroft & Upcroft, 2001a).

Uma recente revisão do grupo dos Upcroft aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento não apenas da giardíase, como também para a amebíase e outras protozooses (Wright *et al.*, 2003).

A busca de novos fármacos para uso no combate a parasitoses intestinais vem sendo considerável. No que concerne a giardíase, diferentes drogas têm sido utilizadas, mas nenhuma é plenamente satisfatória, principalmente pela alta incidência de efeitos colaterais que justificam as contra-indicações e ocorrência significativa de falhas no tratamento. Nesse sentido, é de fundamental importância a realização de novas pesquisas em estratégias terapêuticas para a giardíase, tornando-se uma área de desenvolvimento em potencial nos próximos anos (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.7. DISSULFIRAM: NOVOS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

O dissulfiram, ou tetraetiltiuram dissulfeto, tem sido usado por mais de meio século para terapia de aversão ao álcool, através da inibição da enzima hepática aldeído desidrogenase (ALDH) (Sauna *et al.*, 2005). Sua farmacocinética tem sido extensivamente estudada, sendo considerada pela FDA e OMS uma droga segura e eficaz. Nesta última década numerosos relatos vêm sugerindo a utilização deste fármaco no tratamento do câncer e infecções fúngicas (Sauna *et al.*, 2005). A reversão do fenótipo MDR (Resistência a Múltiplas Drogas) pela inibição dos transportadores ABC, através de sua ligação com um de seus membros, a P-glicoproteína (Pgp) (Loo & Clarke, 2000; Sauna *et al.*, 2004), e seus poucos efeitos colaterais, mesmo em uso prolongado (Brewer, 1984; Chick, 1999; Brar *et al.*, 2004) fazem do dissulfiram uma droga com múltiplos alvos terapêuticos em potencial.

Recentes estudos do mecanismo pelo qual o dissulfiram exerce seus efeitos anti-álcool tem fornecido evidências para a formação de um intermediário reativo que é um potente agente carbamilante para grupos sulfidríla (Madan *et al.*, 1995). No organismo, esta droga é rapidamente e completamente reduzida a dietilditiocarbamato (DETC) (Cobby *et al.*, 1977), um conhecido inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) (Guzik *et al.*, 2005) e que forma conjugados com a *N*-acetilcisteína (NAC) (Hu *et al.*, 1997). O DETC já teve sua atividade relatada para vários protozoários parasitas, a exemplo de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e algumas espécies do gênero *Plasmodium* (Giulivi *et al.*, 1988; Bouma *et al.*, 1998; Deharo *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* possui uma larga distribuição mundial, causando síndrome da má absorção, perturbações intestinais, com dores abdominais, eliminação de fezes diarréicas e eventualmente esteatorréia. Artrite reativa também tem sido relacionada ao parasitismo por *G. Lamblia*. (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003). Vários relatos têm associado a prevalência de doenças infecciosas intestinais e status nutricional afetando ainda mais a função cognitiva, aproveitamento escolar e desenvolvimento físico de crianças (Olness, 2003).

Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, o que aumenta as taxas de prevalência nestes locais, chegando em torno de 30%, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS, 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002). Em 2004, *Giardia* foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido à sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006).

Doenças diarréicas são a causa principal de morbidade na maioria dos países em desenvolvimento (Pimentel *et al.*, 2007). A este respeito, o advento de novas drogas seguras e eficazes na terapia contra a giardíase, aliado a programas preventivos em regiões endêmicas para esta doença, poderiam reduzir consideravelmente os custos com o tratamento (Savioli *et al.*, 2006). Os impactos sócio-econômicos oriundos de políticas que promovem a saúde pública incluem uma melhor formação de recursos humanos, pela melhora do desenvolvimento cognitivo de crianças, com concomitante aumento na geração de postos de trabalho. Por conseqüência, haveria uma melhora na qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Nosso trabalho tem como objetivo geral o estudo do mecanismo de ação do dietilditiocarbamato (DETC) em trofozoítos de *Giardia lamblia*, objetivando uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais no tratamento contra a giardíase.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinação da suscetibilidade parasitária (IC_{50}) através de ensaios de proliferação.
- 2) Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.
- 3) Avaliação dos danos oxidativos celulares, por quantificação bioquímica da peroxidação lipídica induzida pelo DETC.
- 4) Quantificação colorimétrica de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 5) Análise por microscopia para localização da expressão de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*, através de sonda fluorescente.
- 6) Detecção de radicais livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*, pelo uso de sonda fluorescente.
- 7) Elucidação dos efeitos microbicidas do fármaco por microscopia eletrônica de transmissão, para a observação da ultraestrutura celular do parasito, possivelmente permitindo a compreensão do modo de ação do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2. Cultivo de *Giardia lamblia*

A cepa de *G. lamblia* a ser utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof^o. Dra. Frances D. Gillin, do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB são axenicamente cultivados em tubos cônicos de vidro (aproximadamente 10 mL), em meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina e 10% (volume/volume) de soro bovino inativado a 56°C por uma hora (Keister, 1983), à temperatura de 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 a 72 horas.

O meio TYI-S-33 é preparado com a seguinte composição: 19,5 mg/mL de caseína, 10,5 mg/mL de extrato de levedura, 10 mg/mL de dextrose, 2 mg/mL de cloreto de sódio, 0,6 mg/mL de fosfato de potássio monobásico, 1 mg/mL de fosfato de potássio dibásico, 2 mg/mL de L-cisteína, 1 mg/mL de bile bovina e 0,2 mg/mL de ácido ascórbico. O pH é ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1N. O meio é esterilizado em filtro a vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

4.3. Ensaio de inibição

Inóculos de 1 a 2 x 10⁵ trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DETC e/ou metronidazol, por 24 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Inóculos de 1×10^6 esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 μL de [^3H]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1 μCi /poço, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5. Detecção de tióis totais

Inóculos de 2×10^4 trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em tubos de 15 mL por 60-72 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC e/ou metronidazol. Em seguida as células foram centrifugadas a 500 X g por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM, pH 8,2. A 20 μL da amostra foram adicionados 75 μL do mesmo tampão, 25 μL do reagente DTNB e 400 μL de metanol, sendo após centrifugado a 1500 X g por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

4.6. Lipoperoxidação

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC e/ou N-acetilcisteína (NAC). Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação a 500 X g por 10 minutos em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após centrifugação, 200 μL de 0,1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados a 200 μL de células em suspensão e incubados a 100°C por 3 horas. A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida a 532 nm e a absorbância foi comparada ao padrão obtido usando 0.1% TBA e PBS, à proporção de 1:1.

4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca/Mg, pH 7,2 por centrifugação a 500 X g por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo 25 μM da sonda 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Molecular

Probes). Após o período de incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes, montados em lâminas e observados ao microscópio de fluorescência.

4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol

Trofozoítos foram fixados por 30 min a 4°C em 1% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Para a adesão dos trofozoítos, as lamínulas foram lavadas com extran neutro, submersas em etanol 70% e secas sem contato manual. Foram colocadas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro e recobertas com solução de 0,1 % de poli-*L*-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Retirado o excesso desta solução, as lamínulas foram secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e, novamente, secas. As células aderidas por 30 minutos às lamínulas foram incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propilgalato e observadas no microscópio de fluorescência.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento com as drogas, as células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio neste tampão. Em seguida os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e infiltrados em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por 48 hs a 60°C, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 400 e contrastados em 5% de acetato de uranila e 15% de citrato de chumbo. As grades são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos estão representados como a média \pm desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível

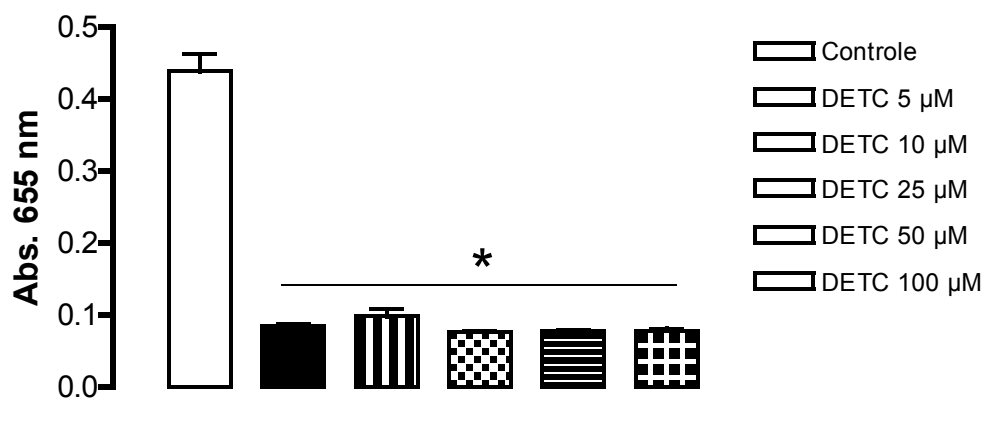
de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de *G. lamblia*

Para avaliar a atividade inibitória do DETC na proliferação celular de *G. lamblia*, nós realizamos experimentos de dose-resposta, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM , por 24 horas. O DETC diminuiu significativamente a proliferação dos trofozoítos, não havendo diferença significativa entre as concentrações utilizadas, presumivelmente por uma ausência de efeito giardicida dose-dependente nestas concentrações (Fig. 4A). O valor de IC_{50} do DETC foi aproximadamente de 2,0 μM , o que demonstra a efetividade do DETC contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, tendo seu efeito comparado ao metronidazol, com valores de IC_{50} em torno de 1,5 μM . Apesar de discreto, aparentemente há uma relação de dose-dependência para o efeito inibitório do metronidazol neste parasito nas concentrações utilizadas (Fig. 4B).

(A)



(B)

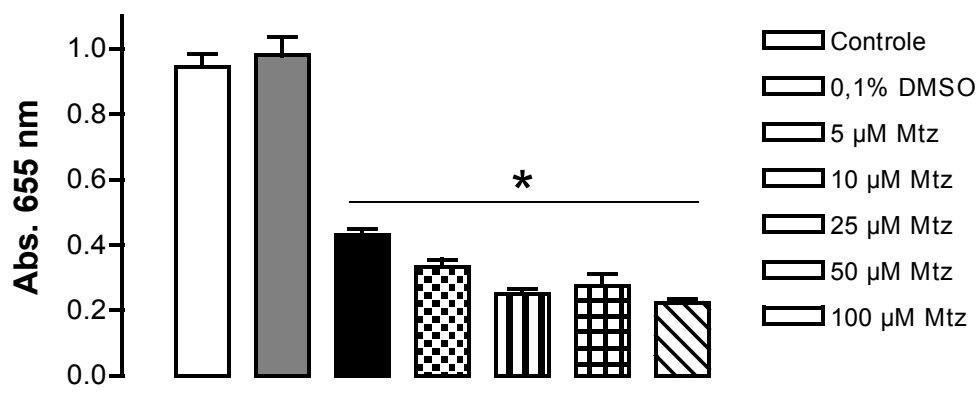


Figura 4. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular. Trofozoítos de *Giardia lamblia* expostos a diferentes concentrações de DETC e metronidazol. (A) Após 24 horas de incubação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com DETC, porém o efeito não foi dose-dependente nas concentrações testadas. (B) Em células tratadas com o metronidazol, observamos uma inibição significativa do crescimento em comparação com as células tratadas com 0,1% de DMSO, havendo uma redução dose-dependente discreta na proliferação entre 5 25 µM de concentração da droga. (*, $p < 0,001$).

5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação da concentração inibitória do DETC e metronidazol neste protozoário, nós avaliamos a associação de ambas as drogas para verificar um possível efeito sinérgico em trofozoítos de *G. lamblia*. Em células tratadas com 1 μM de DETC por 24 horas, não houve uma inibição significativa do crescimento, bem como em parasitos tratados com 1 μM de metronidazol, nas mesmas condições (Fig. 5). Quando nós fizemos as associações do DETC com o metronidazol, em diferentes concentrações de ambas e em um mesmo período de incubação, verificamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e algumas combinações, especialmente quando a concentração do metronidazol está acima de 0,5 μM , o que não ocorre quando comparamos estas combinações com o DETC ou metronidazol isoladamente (Fig. 5). Estes resultados sugerem que não há um efeito sinérgico entre estes compostos em trofozoítos de *Giardia lamblia* nas concentrações utilizadas, já que os valores de IC_{50} de ambas as drogas se encontram próximos aos valores empregados experimentalmente neste estudo.

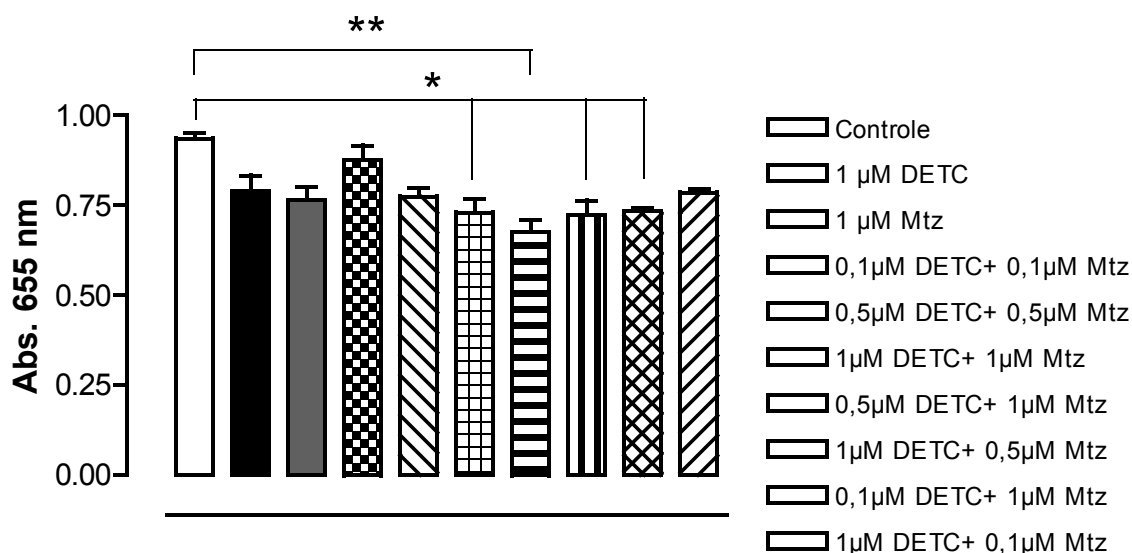


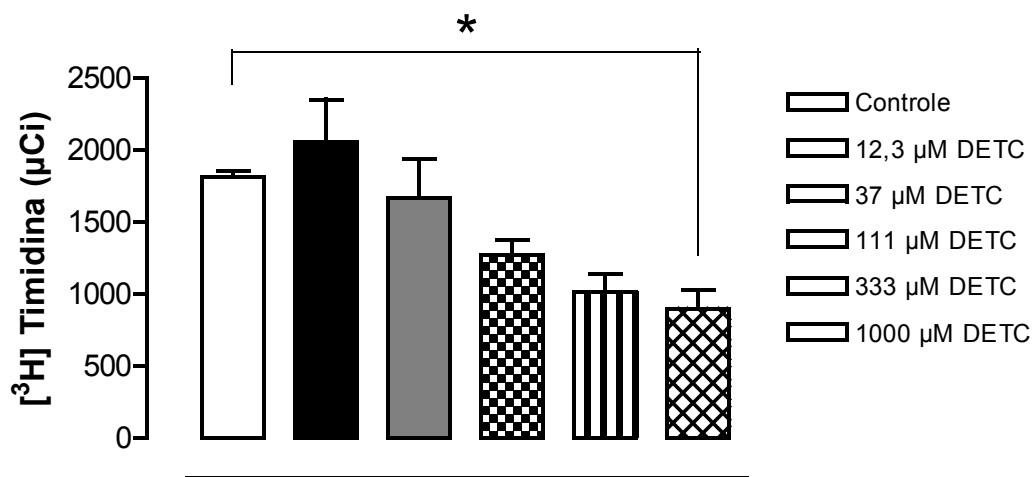
Figura 5. Avaliação de possível sinergismo entre DETC e metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*. As células foram incubadas com ambas as drogas em diferentes combinações ou isoladamente, por 24 horas. Houve uma inibição estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; **, $p <$

0,01) da proliferação celular em parasitos tratados com concentrações mais elevadas de ambas as drogas, porém os resultados não indicam efeito sinérgico desta associação.

5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos do DETC em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com DETC, verificamos uma diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Fig. 6A). O valor de IC₅₀ para este composto em esplenócitos foi cerca de 217 µM, muito acima dos valores encontrados para seu efeito giardicida. O metronidazol não causou citotoxicidade em esplenócitos (Fig. 6B) nas mesmas concentrações utilizadas para o DETC, sugerindo que estas células são menos suscetíveis à ação do 5-nitroimidazol em comparação ao tiocomposto. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o DETC causa seu efeito citotóxico em células do baço difere significativamente do utilizado para ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

(A)



(B)

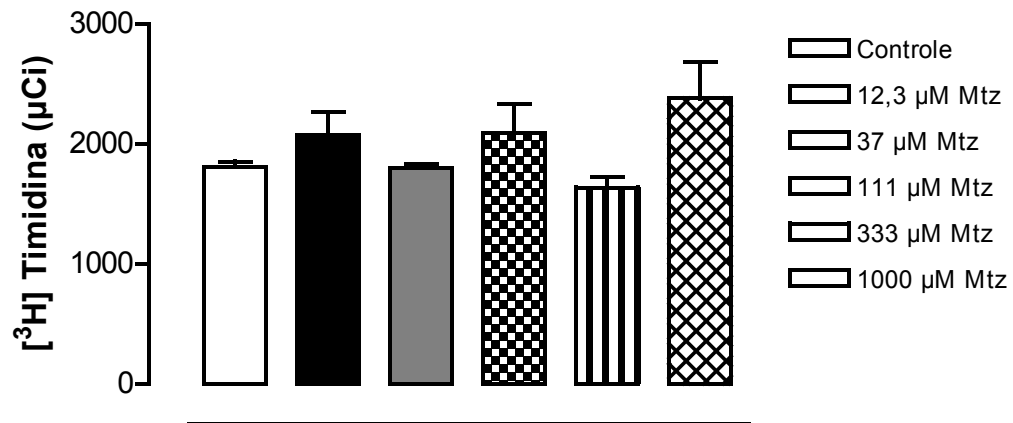


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos. Células do baço de camundongos Balb/C foram tratadas com DETC (A) ou metronidazol (B), por 24 horas. Houve uma redução da taxa de proliferação dos esplenócitos tratados com DETC, indicada pela redução da incorporação de timidina com o aumento da concentração da droga. (* $p < 0,05$). O metronidazol não reduziu a incorporação de timidina destas células, nas mesmas concentrações.

5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para verificar os possíveis efeitos causados pelo DETC neste parasito, testamos se a atividade giardicida desta substância está associada com o conteúdo dos tióis livres através da detecção pela sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA), que se liga seletivamente a grupos tiol em presença de grupamentos amino. Em parasitos controle foi observada uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de algumas células (Fig. 7A). Em parasitos tratados com DETC a 200 μ M por 24 horas, algumas células apresentavam uma marcação com intensidade menor ou ausente em comparação ao controle, indicando que o DETC está bloqueando os tióis da célula (Fig. 7C). Este resultado indica a participação dos tióis livres no efeito giardicida do composto.

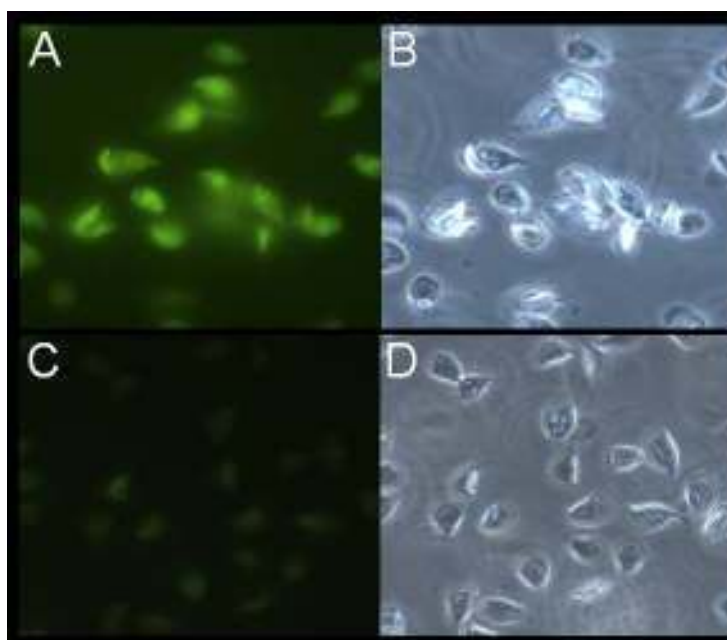


Figura 7. Análise do conteúdo de tióis livres em trofozoítos de *G. lamblia*. Detecção de grupos sulfidríla através da sonda fluorescente *orto*-phthaldialdeído (OPA – A e C). Células controle apresentam uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de alguns trofozoítos (A). Trofozoítos de *Giardia lamblia* tratados com 200 μ M de DETC por 24 horas, apresentando uma fraca marcação (C) em relação ao controle. Visualização das células por microscopia de contraste de fase (B e D).

5.5. Determinação de tíóis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com o objetivo de detectar as concentrações totais de grupos tiol presentes neste parasito, foi utilizado o reagente de Ellman (1959), que determina quantitativamente grupos sulfidril em amostras biológicas. Após 2 horas de incubação com 100 μM de DETC, foi possível observar um decréscimo do conteúdo de grupamentos tiol totais em comparação ao controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Fig. 8). O metronidazol nas mesmas concentrações não levou à diminuição destes grupos sulfidril, com níveis de detecção comparáveis aos do controle. Quando as células foram incubadas com a associação de ambos, observamos uma diminuição da expressão de grupamentos tiol, porém houve um discreto aumento em comparação ao DETC. Estes resultados sugerem que o DETC diminui a capacidade antioxidante de *G. lamblia* através do decréscimo da expressão de grupos tiol presentes neste parasito, não havendo efeitos aditivos ou sinérgicos entre os compostos.

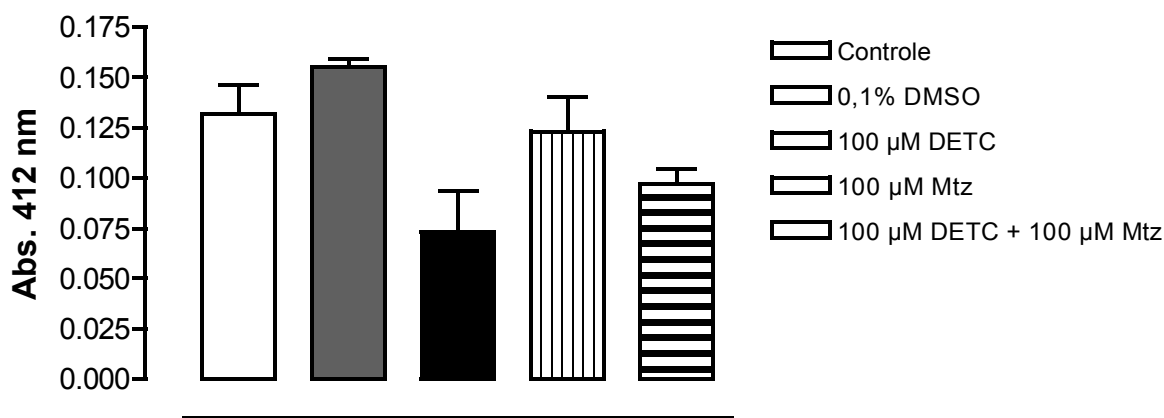


Figura 8. Quantificação dos grupos sulfidril em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Houve uma diminuição dos níveis de tíóis totais em células tratadas com 100 μM de DETC por 2 horas em relação ao controle, porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Parasitos tratados com metronidazol apresentaram valores semelhantes ao controle e a combinação do DETC com o metronidazol levou a um discreto aumento dos níveis de tíóis livres em comparação ao DETC.

5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação dos tióis livres, nós avaliamos a participação destes grupamentos na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*. Em células tratadas com 25 μM de DETC por 24 horas, observamos um decréscimo na proliferação celular em relação às células controle (Fig. 9). A adição de 25 μM de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultura não afetou a proliferação do parasito *in vitro*. A incubação das células com DETC e NAC, ambos a 25 μM , levou à reversão parcial do efeito giardicida do DETC, aumentando discretamente à medida que elevamos a concentração do NAC (Fig. 9). Estes dados indicam que o efeito do DETC nestas células está associado, ao menos parcialmente, com os grupamentos tiol presentes neste parasito, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, já que a NAC não foi capaz de reverter totalmente os efeitos causados pelo DETC.

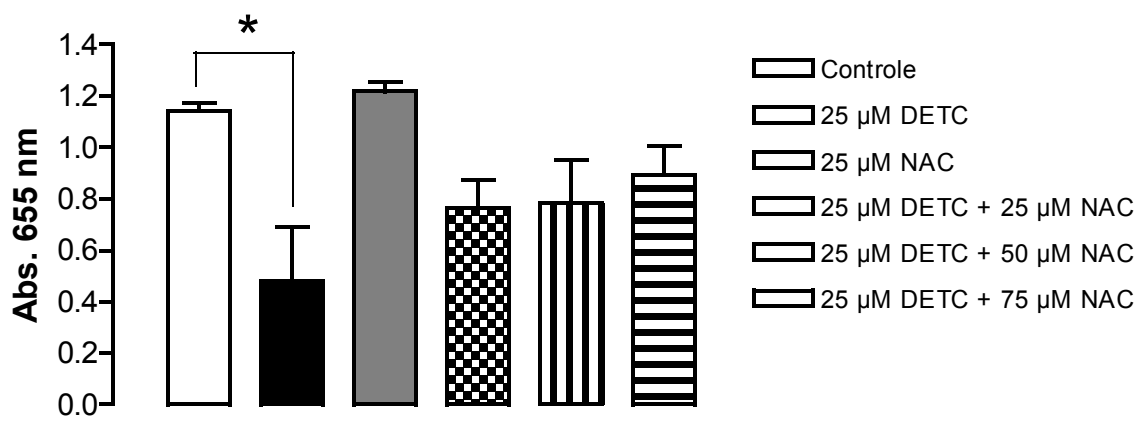
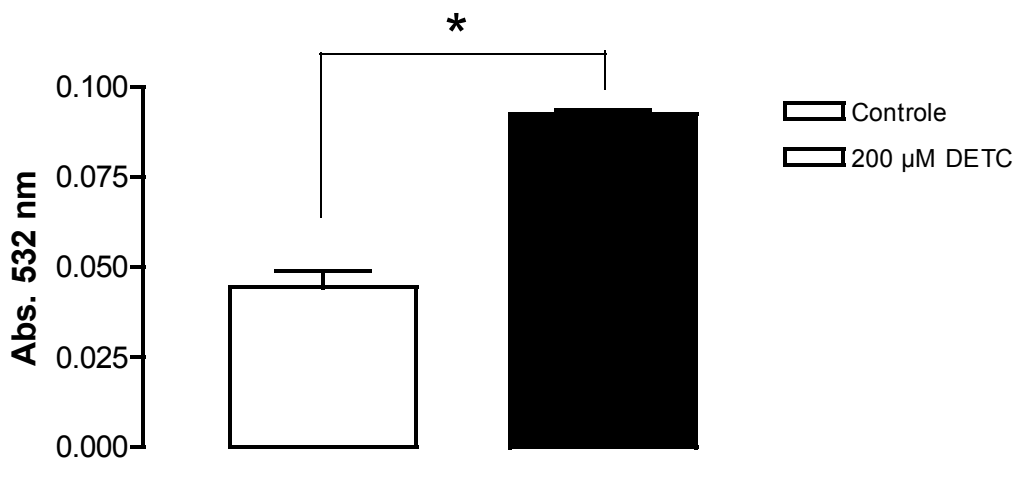


Figura 9. Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de *Giardia* em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC). Células tratadas com 25 μM de DETC apresentaram uma redução na proliferação em comparação ao controle (*, $p < 0,05$). Quando associamos o NAC ao DETC em diferentes proporções há uma reversão parcial do efeito inibitório do DETC.

5.7. Quantificação de lipoperoxídeos em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com a observação de que o DETC é capaz de diminuir os níveis de tióis livres neste parasito e por conseqüência a sua capacidade antioxidante, decidimos verificar os danos oxidativos celulares através da quantificação bioquímica da peroxidação lipídica através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas, houve um aumento significativo desta lipoperoxidação (Fig. 10A). A associação do DETC com a NAC foi capaz de reverter a lipoperoxidação causada pelo DETC (Fig. 10B). Estes dados sugerem que o DETC está elevando o estresse oxidativo, sendo este efeito modulado por cisteína, possivelmente pela interação destas duas moléculas com conseqüente inibição da atividade do DETC.

(A)



(B)

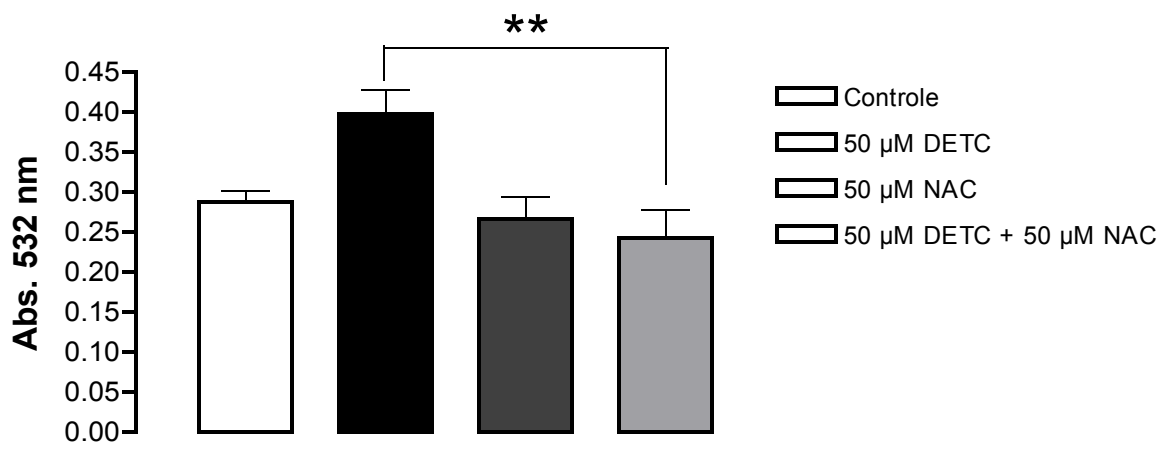


Figura 10. Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células tratadas com 200 μM de DETC por 4 horas apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle (*t* de Student, * $p < 0,001$). **(B)** Houve uma reversão dos efeitos do DETC quando foi realizado o co-tratamento com a NAC, em parasitos tratados por 2 horas (** $p < 0,05$).

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Como um dos efeitos do DETC é o aumento dos danos oxidativos celulares em trofozoítos de *Giardia*, resolvemos em seguida avaliar a produção espécies reativas através da sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes), que é permeável à membrana celular, se tornando impermeável no espaço intracelular quando se liga a espécies reativas de oxigênio, emitindo fluorescência. A maioria das células controle estavam viáveis, com grande motilidade ou aderidas à lâmina de vidro, não apresentando marcação para a sonda (Fig. 11A - B). Os trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora se encontravam menos móveis e com alterações morfológicas na superfície celular. Nestas células observou-se uma marcação homogênea (Fig. 11C), um pouco mais pronunciada em regiões de protuberância membranosa, conhecidas como “blebs” (Fig. 11D). Assim como no controle, as células tratadas com 200 µM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação para a sonda. Isto provavelmente se deve ao fato de que a grande maioria destas células já estavam mortas, não sendo possível a detecção da sonda intracelularmente (Fig. 11E - F).

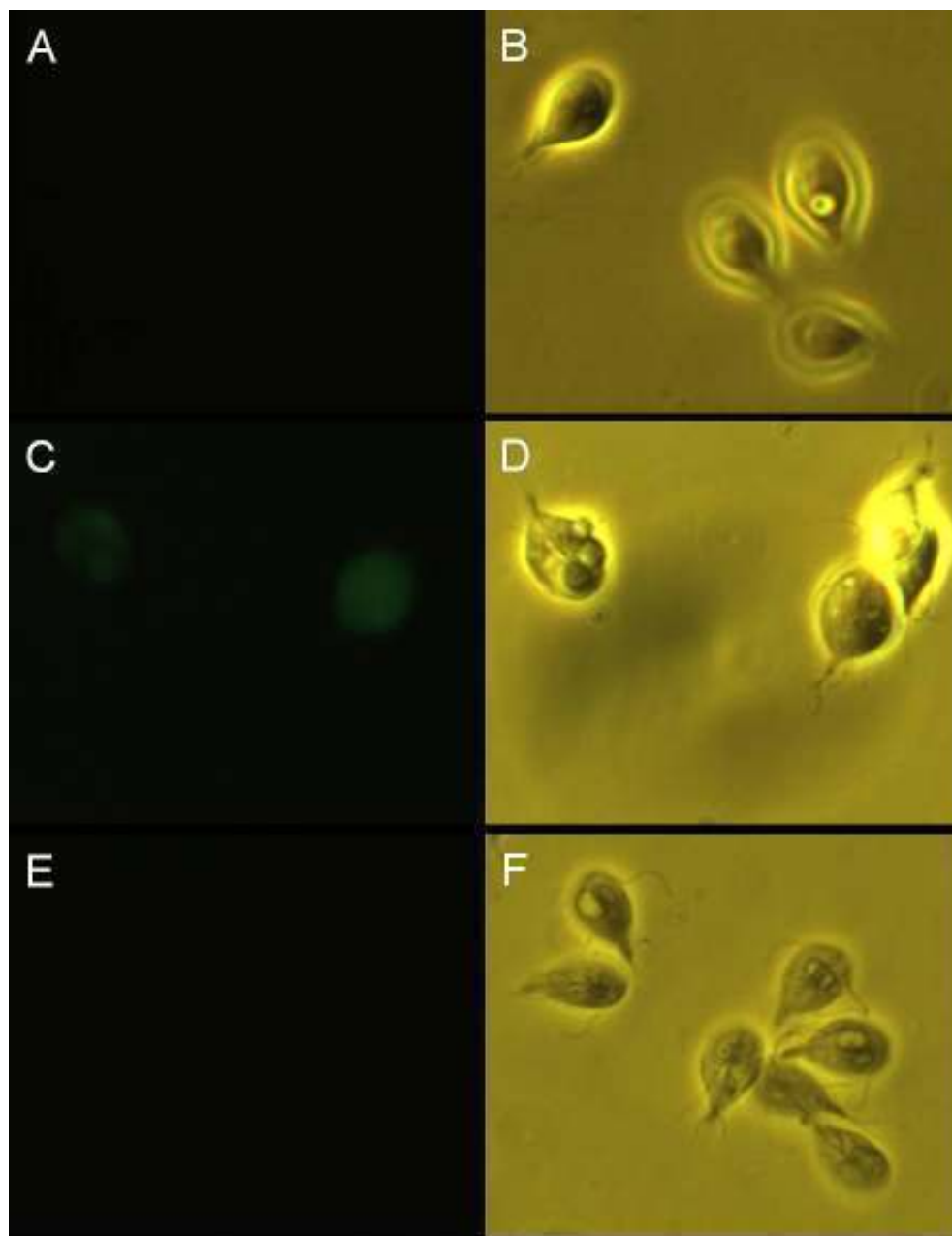


Figura 11. Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia*. A sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para detecção de espécies reativas neste parasito. Células controle não apresentaram marcação. (A e B) O tratamento com 100 μM de DETC por 1 hora levou ao aparecimento de células com alterações morfológicas (D) e marcadas com a sonda fluorescente (C). Trofozoítos tratados com 200 μM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação com H₂DCFDA (E), possivelmente porque estas já estavam mortos (F).

5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC

Para entender melhor os efeitos do DETC em trofozoítos de *G. lamblia*, nós incubamos as células em presença ou ausência de 200 μM desta substância por 24 horas e depois de processadas, foram visualizadas em MET. As células controle apresentavam-se íntegras com uma grande quantidade de partículas de glicogênio e cisternas de retículo endoplasmático distribuída pelo citoplasma (Fig. 12A). Vesículas periféricas foram observadas subjacentes à membrana plasmática (Fig. 12B). Nestas células também podemos verificar em corte transversal estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos, o funis (Fig. 12C) e o disco adesivo (Fig. 12D). Os núcleos, presentes na região anterior dos parasitos, encontravam-se homogêneos, bem delimitados pela membrana nuclear (Fig. 12D). Em parasitos tratados com DETC, mais de 50% das células apresentavam-se com alto grau de extração citoplasmática, inclusive do conteúdo nuclear (Fig. 13A). Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito (Fig. 13B), sugerido pela presença de estruturas virguliformes ou com dupla membrana circunscrevendo porções citoplasmáticas. Possível participação do retículo endoplasmático é sugerida, já que este se encontrava dilatado e próximo às vesículas (Fig. 13C), que também se apresentaram maiores e menos numerosas do que no controle, sugerindo a ocorrência de confluência das mesmas (Fig. 13D).

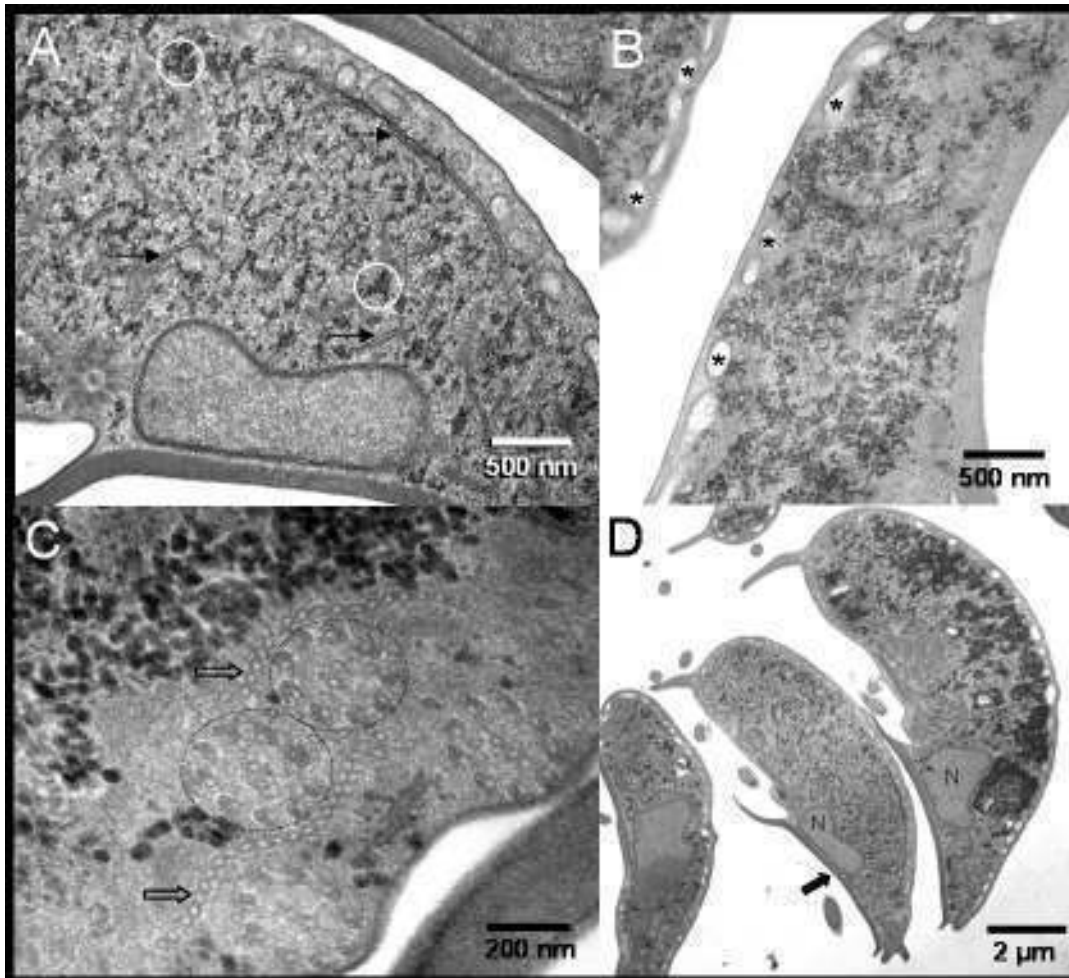


Figura 12. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células controle apresentando citoplasma homogêneo, com grânulos de glicogênio (assinalado por círculos brancos) e retículo endoplasmático (setas). Em (B), visualizamos as vesículas periféricas (*) na região dorsal da célula. (C) Estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (assinalados por círculos pontilhados) e o corpo funis (setas). Em (D), observamos células em corte longitudinal apresentando núcleos (N) e o disco adesivo (seta).

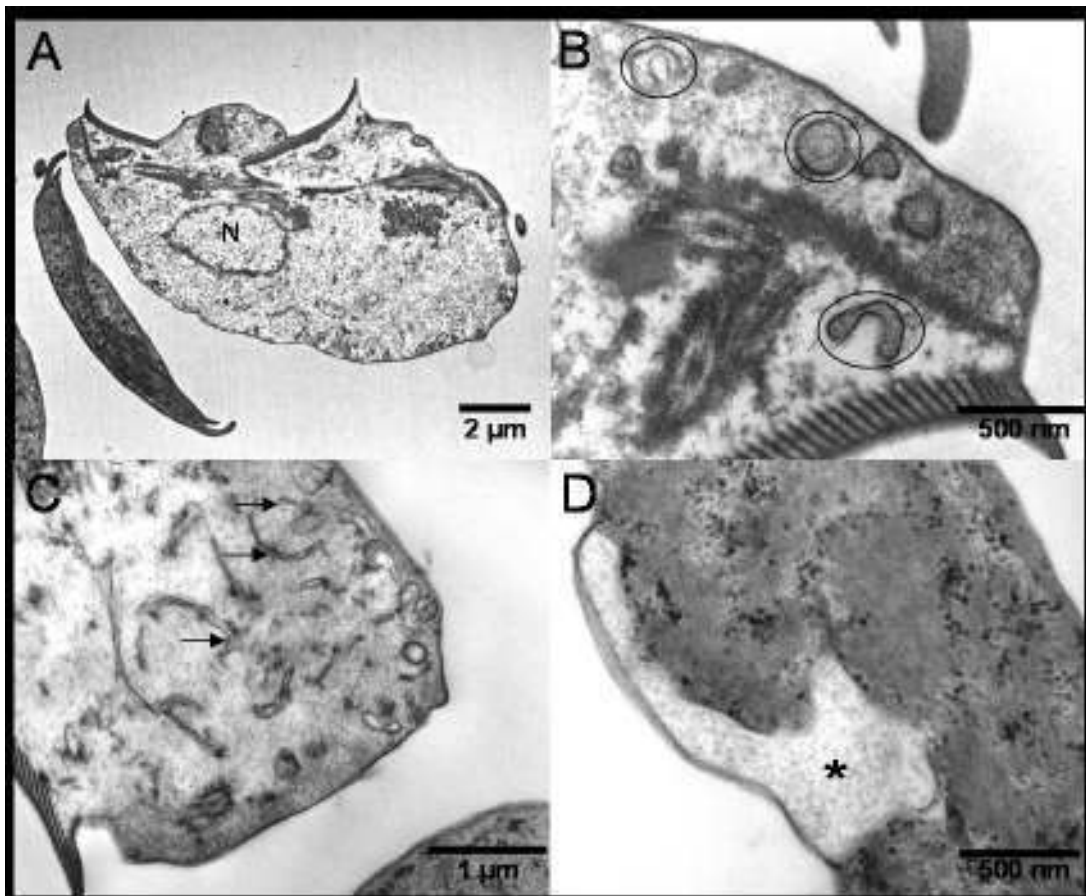


Figura 13. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *G. lamblia* tratados com DETC. (A) Células tratadas com 200 µM de DETC por 24 horas apresentando reduzida eletrondensidade de citoplasma e nucleoplasma, em comparação às células controle (Fig. 12). (B) Visualização de vesículas virguliformes ou com dupla membrana (assinaladas por círculos), sugerindo possíveis processos autofágicos. Em (C), observamos este mesmo processo, com provável participação do retículo endoplasmático, que se encontra mais dilatado quando comparado ao controle. Em (D), visualizamos uma célula apresentando grande compartimento alongado, presumivelmente formado pela fusão homofílica das vesículas periféricas.

6. DISCUSSÃO

A elucidação dos efeitos do DETC, um conhecido inibidor de SOD, é de importância fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em sua atividade giardicida, já que a ausência de SOD em *Giardia* nos permite evidenciar a existência de efeitos independentes desta enzima, produzidos pela ação do DETC em protozoários parasitas.

Apesar de ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, a inibição da proliferação celular pelo DETC aparentemente não é dose-dependente. Uma das possíveis explicações para este fato é que esta substância pode ser oxidada de forma muito rápida, principalmente em soluções, perdendo parte da sua atividade. Outra possibilidade é que o composto atue sobre um limitado “pool” de resíduos de cisteína, assim o efeito atingiria um plateau ao reagir com os grupos SH disponíveis. A manipulação deste composto precisa ser feita com presteza, evitando sua exposição ao ar e/ou aumento da temperatura. Embora seja uma droga relativamente instável, seu efeito giardicida é bastante satisfatório, com níveis comparáveis ao do metronidazol *in vitro*.

O dissulfiram, medicamento utilizado no tratamento contra o alcoolismo, age como um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Brien & Loomis, 1985). Este fármaco sofre rápida redução enzimática no sangue pela glutatona redutase (Strömme, 1963; Cobby *et al.*, 1977), mas pode também ser reduzido de forma não enzimática pela albumina (Agarwal *et al.*, 1983). Subseqüentemente, DETC é metabolizado por tiol metiltransferase ou tiopurina metiltransferase a DETC-Me (Gessner & Jakubowski, 1972; Glauser *et al.*, 1993; Lill *et al.*, 1996), que sofre oxidação principalmente pelo citocromo P-450, com uma contribuição minoritária de flavina monooxigenases (Johansson *et al.*, 1989). Os metabólitos oxidados do dissulfiram têm sido descritos como potentes inibidores da ALDH, através da carbamilação de um grupo tiol crítico no sítio ativo da enzima (Jin *et al.*, 1994; Tonkin *et al.*, 2003).

Por ser reduzido rapidamente *in vivo* a DETC, o dissulfiram se torna uma poderosa ferramenta quimioterápica no tratamento contra a giardíase. Este fármaco já foi testado *in vitro* e *in vivo* contra *Giardia lamblia* (Nash & Rice, 1998), com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para o DETC com trofozoítos *in vitro*.

Quando analisamos a associação do DETC com o metronidazol, verificamos que não houve um efeito sinérgico entre estas duas drogas. Em *Entamoeba histolytica*, o metronidazol é

capaz de se ligar covalentemente a algumas proteínas específicas, incluindo superóxido dismutase e tioredoxina redutase, esta última sendo uma das responsáveis pela ativação do metronidazol neste protozoário através da redução do grupo nitro (Leitsch *et al.*, 2007). Além disso, os níveis de cisteína são reduzidos com a adição do metronidazol, provavelmente pela reação desta droga com os grupos sulfidríla acessíveis neste parasito (Leitsch *et al.*, 2007). Como a tioredoxina redutase é uma enzima muito comum, é provável que processos similares ocorram em outros organismos procarióticos e/ou eucarióticos. Nesse sentido, o efeito giardicida do DETC e metronidazol pode estar associado à competição de ambas as drogas pelos mesmos mecanismos de ativação em *Giardia lamblia*, que apresenta uma enzima semelhante à tioredoxina redutase, a dissulfeto redutase (Brown *et al.*, 1996b) e proteínas ricas em cisteína (Luján & Nash, 1994). Em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, o mecanismo deste 5-nitroimidazol está relacionado à sua redução pela piruvato:ferredoxina oxidorreductase a radicais citotóxicos que levam a danos irreversíveis e morte celular (Müller, 1986). Apesar disso, resistência ao metronidazol em *E. histolytica* pode ser atribuída à diminuição de enzimas antioxidantes, como peroxiredoxina (Wassmann *et al.*, 1999) e superóxido dismutase (Samarawickrema *et al.*, 1997), assim como em *G. lamblia*, onde o aumento da atividade da enzima NADH oxidase tem sido associado a cepas resistentes ao metronidazol (Ellis *et al.*, 1993).

Alguns trabalhos têm desencorajado a utilização do dissulfiram e metronidazol em associação, principalmente pelo acúmulo de acetaldeído causado pela inibição da enzima ALDH por estes fármacos (Gardner & Hill, 2001) em pacientes que fazem ingestão de álcool, levando ao efeito “antabuse” (sensação de calor, náusea, vômitos e taquicardia) (Finegold, 1980; Edwards *et al.*, 1986; Krulewitch, 2003). A utilização destas duas drogas em conjunto poderia potencializar este efeito, além de causar em alguns pacientes reações psicóticas, conforme alertado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu bulário eletrônico.

Quando analisamos a incorporação de timidina por células do baço na presença de diferentes concentrações de DETC ou metronidazol, observamos que não houve uma diferença significativa nos níveis de incorporação entre as células controle e tratadas com o metronidazol. No entanto, o DETC apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas concentrações acima de 111 μM . Apesar disso, o valor de IC_{50} encontrado para trofozoítos de *Giardia* (*i.e.* 2 μM) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A farmacocinética e os efeitos colaterais do dissulfiram têm sido extensivamente estudados, gerando dados para a elaboração de formulações e regimes terapêuticos apropriados. Sua biodisponibilidade é maior que 80% após administração oral e a eliminação do dissulfiram e seus metabólitos é um processo lento. Aproximadamente 20% da droga permanece no corpo após 1 a 2 semanas (Ellenhorn *et al.*, 1997 *apud* Sauna *et al.*, 2005). Apesar de ser recomendado o monitoramento de pacientes que usam altas doses do dissulfiram (acima de 250 mg por dia) (Fuller & Gordis, 2004), existem poucos efeitos colaterais associados com longos períodos de tratamento. Hepatotoxicidade é a causa mais comum de preocupações durante a utilização do dissulfiram (Sauna *et al.*, 2005), contudo este efeito adverso é geralmente reversível quando seu uso é interrompido na presença de manifestações clínicas (Wright *et al.*, 1988). A excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais graves tornam o dissulfiram uma droga segura e eficaz, inclusive com aprovação pela FDA e ANVISA.

A redução nos níveis de grupamentos tiol em trofozoítos tratados com DETC foi observada tanto por microscopia de fluorescência, quanto pela avaliação quantitativa através do reagente de Ellman (DTNB). Estes resultados sugerem que o DETC esteja carbamilando e/ou formando pontes dissulfeto com grupamentos tiol livres que estão presentes em *Giardia* e que são responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito, a exemplo das proteínas ricas em cisteína e dissulfeto redutase. De modo interessante, a atividade do dissulfiram em trofozoítos de *G. lamblia* foi reduzida pela adição de cisteína ao meio (Nash & Rice, 1998), sugerindo que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga. O metronidazol também reduziu os níveis de tióis totais em *Giardia*, porém não houve diferenças entre o tratamento com as drogas feito isoladamente ou em conjunto.

Cepas de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol estão associadas a um aumento da atividade da enzima NADH oxidase, possibilitando a detoxificação de espécies oxidativas (Ellis *et al.*, 1993). É provável que cepas sensíveis ao metronidazol sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, já que estas apresentam diminuição do consumo de O₂ (Ellis *et al.*, 1993), com possível redução dos níveis de grupos sulfidril livres, que podem ser oxidados através da ativação do grupo nitro deste fármaco.

Para confirmar o papel dos grupamentos tiol no efeito giardicida do DETC, nós incubamos os trofozoítos de *Giardia* em concentrações crescentes de NAC, associadas ou não a este composto. Não houve diferenças significativas entre células tratadas com 25 µM de NAC e o

grupo controle, porém houve uma diminuição significativa da proliferação celular quando adicionamos 25 μ M de DETC ao meio de cultura. A pré-incubação do NAC com o DETC na proporção 1:1 reverteu parcialmente a inibição, aumentando discretamente à medida que esta proporção de NAC foi aumentada. A presença de resíduos de cisteína tem sido enfatizada na literatura como um fator de crescimento essencial para *Giardia lamblia* (Luján & Nash, 1994), conferindo proteção contra os efeitos letais do oxigênio (Fairlamb, 1989). As análises de incorporação de L-cisteína por este parasito indicam a presença de ao menos dois sistemas de transporte. L-cistina não foi incorporada pelos trofozoítos, sugerindo a ausência de um sistema de transporte e a especificidade dos transportadores de cisteína. *Giardia* não é capaz de sintetizar cisteína ou metionina a partir de sulfato, nem de converter metionina em cisteína, sendo assim o protozoário é auxotrófico para este aminoácido (Luján & Nash, 1994).

As CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície (VSPs), são os principais antígenos de *Giardia lamblia*. Cerca de 150 diferentes genes que codificam estas proteínas tem sido identificados no genoma deste parasito. Somente uma VSP é expressa por trofozoíto, permitindo que *Giardia* mude a expressão desta proteína em sua superfície (Nash, 2002). O mecanismo desta variação antigênica ainda não está claro, mas este não envolve rearranjo de DNA e é refletido por mudanças na expressão gênica em nível de RNA mensageiro (Nash, 2002). Diferenciação pode induzir variação antigênica *in vitro* (Svärd *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002;) e *in vivo* (von Allmen *et al.*, 2004). Análises de anticorpos IgA anti-*Giardia* em leite materno de mães que vivem em área endêmica de giardiase, provavelmente com múltiplas infecções com diferentes cepas de *Giardia*, revelou que as VSPs são as proteínas imunorreativas dominantes (Téllez *et al.*, 2005).

Estes dados nos indicam que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga, apesar de não ser o único. Em 1930, o dissulfiram começou a ser utilizado como escabicida e vermicida por ser um quelante de cobre, um componente essencial da cadeia respiratória de artrópodes e helmintos (Eneanya *et al.*, 1981). A atividade quelante de metal também é relatada para o DETC, que é um específico inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (Pritsos *et al.*, 1989; Majid & Nishiyama, 2002). As proteínas com motivos dedo de zinco são essenciais para o funcionamento celular normal (Berg & Shi, 1996), tornando-se um importante alvo terapêutico (Rein *et al.*, 1997). *Giardia* expressa altos níveis de CRP na superfície, as quais

possuem motivos de zinco (Luján *et al.*, 1995c). O zinco pode ser quelado pelo DETC, se apresentando como uma outra via de atuação desta droga neste parasito.

Os danos oxidativos celulares em membranas de trofozoítos tratados com DETC foram avaliados através da formação de um produto citotóxico, o malondialdeído (MDA), que se liga ao TBA gerando uma reação colorimétrica indicativa da peroxidação lipídica (Bellé *et al.*, 2004). Houve um aumento significativo da lipoperoxidação em parasitos tratados com 200 μ M DETC, por 4 horas. O metronidazol levou a um aumento discreto da peroxidação lipídica e a associação entre o DETC e o metronidazol não elevou significativamente a peroxidação, com níveis comparáveis ao DETC utilizado isoladamente, provavelmente porque a concentração do DETC já estava alta, levando ao plateau da peroxidação celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, no entanto as membranas são um dos componentes mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997). Este processo pode levar à morte celular através de alterações na estrutura e permeabilidade de membrana, levando à perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas (Hershko, 1989). O NAC foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do DETC, demonstrando a importância dos grupamentos tiol no mecanismo de ação desta droga.

Baseado na confirmação de que o DETC promove lipoperoxidação, provavelmente pelo aumento da geração de radicais livres de oxigênio, resolvemos avaliar a produção de espécies reativas por esta droga em *Giardia lamblia* com a sonda fluorescente H₂DCFDA. As células controle não apresentaram marcação para a sonda, enquanto que trofozoítos tratados com 100 μ M de DETC por 1 hora foram marcados de forma homogênea, demonstrando que este tiocomposto está aumentando a formação de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Isto se deve ao fato de que a redução de grupos sulfidril livres pode estar afetando o potencial redutor deste parasito, levando ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo não pôde ser visualizado em células tratadas com 200 μ M de DETC, possivelmente porque estas já se encontravam mortas.

Os metabólitos mais comuns produzidos pela utilização do oxigênio em organismos aeróbicos são o radical superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que participa da reação que produz o radical hidroxila (OH[•]), sendo este último extremamente reativo (Cadenas, 1989). Superóxido é usualmente detoxificado pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água por catalase, peroxidase e a enzima dependente de glutatona, glutatona

peroxidase (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). Além destas enzimas de detoxificação convencionais, mecanismos alternativos podem ser utilizados para diminuição do estresse oxidativo celular, que incluem as dioxigenases e monooxigenases (citocromo P-450 redutase) (Malmström, 1982). Algumas oxidases dependentes de flavina (NADH oxidase) reduzem tetravalentemente o oxigênio a água, abolindo a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em bactérias anaeróbicas (Schmidt *et al.*, 1986), assim como a NADH peroxidase, uma flavoenzima envolvida na redução do peróxido que também desempenha papel antioxidante em algumas células (Stanton & Jensen, 1993).

Alguns protozoários microaerófilos também possuem NADH oxidase. *Entamoeba histolytica* contém uma NADPH oxidase dependente de flavina que produz peróxido quando purificada (Lo & Reeves, 1980). *Trichomonas vaginalis* contém uma flavo-oxidase que produz água, além de uma NADPH oxidase produtora de peróxido (Linstead & Bradley, 1988). *Giardia* também apresenta atividades oxidase e peroxidase dependentes de NADH (Brown *et al.*, 1996a; Brown *et al.*, 1998), responsáveis pela capacidade deste parasito de detoxificar o oxigênio. As principais enzimas de detoxificação de espécies oxidantes, como a SOD, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase não estão presentes neste protozoário, salientando a importância da manutenção de um ambiente intracelular redutor através da ciclagem redox pelos grupos sulfidril presentes em *Giardia*.

A elucidação dos efeitos microbicidas do DETC foi possibilitada pela microscopia eletrônica de transmissão, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 200 μM de DETC por 24 horas, houve um alto grau de extração citoplasmática, apresentada por mais de 50% das células. Este efeito é causado provavelmente pelo colapso do potencial de membrana, com conseqüente rompimento da membrana plasmática pelo aumento do estresse oxidativo (Lloyd *et al.*, 2000), onde a indução de radicais livres de oxigênio leva a uma inativação de sistemas que consomem oxigênio, acúmulo de peróxido de hidrogênio e oxidação de grupos tiol.

Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito, sugeridos pela presença de estruturas virguliformes ou com membrana dupla, que são semelhantes à formação dos vacúolos em organismos eucariotos (Suzuki & Ohsumi, 2007; Xie & Klionsky, 2007).

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento de sua homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Os mecanismos

envolvem a formação de uma estrutura de dupla membrana dentro da célula, chamada de vacúolo autofágico ou autofagossomo, a partir do retículo endoplasmático e vias secretórias iniciais. A fusão com o lisossomo gera o autofagolisossomo, onde as enzimas hidrolíticas agem na degradação do conteúdo interno (Shintani & Klionsky, 2004). Resposta a condições de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismos de autofagia. É possível que *Giardia* também utilize destes mecanismos para evitar a perda da homeostasia com o aumento do estresse oxidativo, como ocorre em outros tipos celulares (Hill *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

A observação de vesículas que se encontravam maiores e menos numerosas em comparação ao controle nos leva a crer que ocorreu a fusão homofílica destes compartimentos. Este processo pode ter sido mediado por pontes dissulfeto que se formam pela ação do DETC entre as cisteínas das proteínas celulares, conferindo uma modificação da conformação tridimensional à molécula, expondo sítios de reconhecimento e/ou catalíticos e ocasionando uma série de alterações na morfologia e funcionamento normais da célula.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem do estresse oxidativo e conteúdo de grupos tiol podem prover valiosas estratégias terapêuticas para a giardíase.

7. CONCLUSÕES

7.1. O DETC mostrou-se efetivo na inibição da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, porém este efeito aparentemente não é dose-dependente;

7.2. A associação do DETC com o metronidazol não levou a um efeito sinérgico *in vitro*;

7.3. O DETC promove a redução dos níveis de grupos sulfidril livres, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto e/ou carbamilações em moléculas ricas em cisteína que estejam com estes grupamentos tiol acessíveis, como as CRPs, uma das responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito;

7.4. O aumento do estresse oxidativo em trofozoítos de *G. lamblia* pode ser devido à diminuição da capacidade antioxidante deste protozoário, inviabilizando a sua sobrevivência;

7.5. Os resultados apresentados neste trabalho apontam para uma nova abordagem na terapia contra a giardíase. Estudos para avaliação dos efeitos do DETC *in vivo* se colocam como perspectivas em nosso trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ADAGU, I.S., NOLDER, D., WARHURST, D.C., ROSSIGNOL, J.F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, 49:103-11, 2002.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, 14: 447-75, 2001.

AGARWAL, R.P., MCPHERSON, R.A., PHILLIPS, M. Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 42: 293-310, 1983.

AL-MEKHLAFI, M.S., AZLIN, M., NOR AINI, U., SHAIK, A., SA'IAH, A., FATMAH, M.S., ISMAIL, M.G., AHMAD FIRDAUS, M.S., AISAH, M.Y., ROZLIDA, A.R., NORHAYATI, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 686-91, 2005.

APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, 21: 370-6, 2005.

BASSILY, S., FARID, Z., EL-MASRY, N.A., MIKHAIL, E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J Trop Med Hyg**, 90: 9-12, 1987.

BELLÉ, N.A., DALMOLIN, G.D., FONINI, G., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 22: 245-51, 2004.

BENCHIMOL, M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett**, 1:81-7, 2004.

BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, 511: 133-44, 2002.

BERG, J.M., SHI, Y.. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, 23: 1081-5, 1996.

BERNANDER, R., PALM, J.E., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol**, 3: 55-62, 2001.

BIAGINI, G.A., PARK, J.H., LLOYD, D., EDWARDS, M.R. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. **Microbiology**, 147: 3359-65, 2001.

BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharm. J**, 234: 271-4, 1991.

BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J.P. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**, 42: 817-20, 1998.

BRAR, S.S., GRIGG, C., WILSON, K.S., HOLDER, W.D., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A.J., WHORTON, A.R., STOWELL, G.W., WHITTALL, L.B., WHITTLE, R.R., WHITE, D.P., KENNEDY, T.P.. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol Cancer Ther.** 3: 1049-60, 2004.

BREWER, C. How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. **Br J Psychiatry**, 144: 200-2, 1984.

BRIEN, J.F., TAM, G.S., CAMERON, R.J., STEENAART, N.A., LOOMIS, C.W. A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrazolethiol, calcium carbimide, and disulfiram. **Can J Physiol Pharmacol**, 63: 438-43, 1985.

BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., EDWARDS, M.R., UPCROFT, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Eur J Biochem**, 1:155-61, 1996a.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 20: 211-20, 1996b.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 72: 47-56, 1995.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 61: 155-8, 1993.

BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, 125: 11-9, 2002.

BUSATTI, H.G., GOMES, M.A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, 101: 819-21, 2007.

CACOPARDO, B., PATAMIA, I., BONACCORSO, V., DI PAOLA, O., BONFORTE, S., BRANCATI, G. Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole-resistant giardiasis **Clin Ter**, 146: 761-7, 1995.

CADENAS, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. **J Biolumin Chemilumin**, 4: 208-18, 1989.

CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Bras. Soc. Med. Trop**, 28: 25-31, 1995.

CARRANZA, P.G., FELTES, G., ROPOLO, A., QUINTANA, S.M., TOUZ, M.C., LUJÁN, H.D. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. **Infect Immun**, 70: 5265-8, 2002.

CHICK, J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. **Drug Saf**, 20: 427-35, 1999.

CHIEN, C.T., SHYUE, S.K., LAI, M.K. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. **Transplantation**, 15: 1183-90, 2007.

CIMERMAN, B., CURY, F.M., MORENO, C.T. Avaliação terapêutica do secnidazol dose única no tratamento da giardíase em crianças. **Pediatr. Mod**, 6: 1008-1012, 1994.

COBBY, J., MAYERSOHN, M., SELIAH, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, 202: 724-31, 1977.

CRUZ, C.C., FERRARI, L., SOGAYAR, R. A therapeutic trial in *Giardia muris* infection in the mouse with metronidazole, tinidazole, secnidazole and furazolidone **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 223-8, 1997.

DA COSTA-MACEDO, L.M., MACHADO-SILVA, J.R., RODRIGUES-SILVA, R., OLIVEIRA, L.M., VIANNA, M.S. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum communities of the city of Rio de Janeiro, Brazil **Cad Saude Publica**, 14: 851-5, 1998.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIN, J., LECLAIRE, C. Treatment of giardiasis (lambliasis) with metronidazole. Apropos of 100 cases. **Presse Med**, 6: 15-6, 1962.

DEHARO, E., BARKAN, D., KRUGLIAK, M., GOLENSER, J., GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. **Biochem Pharmacol**, 1: 809-17, 2003.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, 45: 2471-6, 1986.

- DUREL, P., ROIRON, V., SIBOULET, A., BOREL, L.J. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. **Br J Vener Dis**, 36: 21-6, 1960.
- ECKMANN, L., LAURENT, F., LANGFORD, T.D., HETSKO, M.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F., GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol**, 1: 1478-87, 2000.
- EDWARDS, D.L., FINK, P.C., VAN DYKE, P.O. Disulfiram-like reaction associated with intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole and metronidazole. **Clin Pharm**, 5: 999-1000, 1986.
- ELLIS, J.E., WINGFIELD, J.M., COLE, D., BOREHAM, P.F., LLOYD, D. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 23: 35-9, 1993.
- EMMERLICH, V., SCHOLZE, H., GILLIN, F.D., BAKKER-GRUNWALD, T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 87: 112-5, 2001.
- EMMERLICH, V., SANTARIUS, U., BAKKER-GRUNWALD, T., SCHOLZE, H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 131-4, 1999.
- ENEANYA, D.I., BIANCHINE, J.R., DURAN, D.O., ANDRESEN, B.D. The actions of metabolic fate of disulfiram. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 21: 575-96, 1981.
- ERTAN, P., YERELI, K., KURT, O., BALCIOĞLU, I.C., ONAĞ, A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. **Pediatr Int**, 44: 286-8, 2002.
- ESCOBEDO, A.A., CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother**, 8: 1885-902, 2007.
- FAIRLAMB, A.H. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. **Parasitology**, Suppl: 93-112, 1989.
- FARTHING MJ. Giardiasis. **Gastroenterol Clin North Am**, 25: 493-515, 1996.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev**, 13: 35-54, 2000.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J Parasitol**, 77: 441-8, 1991.
- FEELY, D.E., DYER, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. **J Protozool**, 34: 80-3, 1987.

FEITOSA, G., BANDEIRA, A.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R., BRITES, C. High prevalence of giardiasis and stronglyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, 5: 339-44, 2001.

FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev Assoc Med Bras**, 43: 61-8, 1997.

FINEGOLD, S.M. Metronidazole. **Ann Intern Med**, 93: 585-7, 1980.

FERNANDES, P.D., ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz J Med Biol Res**, 30: 93-9, 1997.

FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54: 679-708, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**, 15: 7761-4, 1989.

FULLER, R.K., GORDIS, E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? **Addiction**, 99: 21-4, 2004.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, 14: 114-28, 2001.

GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J., WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther**, 266: 23-32, 1993.

GASCÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, 73: 102-8, 2006.

GESSNER, T., JAKUBOWSKI, M. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester. A metabolite of disulfiram. **Biochem Pharmacol**, 15: 219-30, 1972.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., MCCAFFERY, J.M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679-705, 1996.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. **Infect Immun**, 56: 705-7, 1988.

GILLIS, J.C., WISEMAN, L.R. Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, 51: 621-38, 1996.

GIULIVI, C., TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 30: 243-51, 1988.

GU, F., CRUMP, C.M., THOMAS, G. Trans-Golgi network sorting. **Cell Mol Life Sci**, 58: 1067-84, 2001.

GUERRANT, R.L., KIRCHHOFF, L.V., SHIELDS, D.S., NATIONS, M.K., LESLIE, J., DE SOUSA, M.A., ARAUJO, J.G., CORREIA, L.L., SAUER, K.T., MCCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J Infect Dis**, 148: 986-97, 1983.

GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.T.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop**, 37: 501-06, 1995.

GUZIK, T.J., OLSZANECKI, R., SADOWSKI, J., KAPELAK, B., RUDZIŃSKI, P., JOPEK, A., KAWCZYNSKA, A., RYSZAWA, N., LOSTER, J., JAWIEN, J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., CHANNON, K.M., KORBUT, R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. **J Physiol Pharmacol**, 56: 313-23, 2005.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*-current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res**, 88: 591, 2002.

HARRIS, J.C., PLUMMER, S., LLOYD, D. Antigiardial drugs. **Appl Microbiol Biotechnol**, 57: 614-9, 2001.

HALL, A.; NAHAR, Q. Albendazole as a treatment for infectious with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 87: 84-6, 1993.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.

HILL, B.G., HABERZETTL, P., AHMED, Y., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth muscle cell. **Biochem J**, 3, 2007.

HILL, D.R. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infect. Dis. Clin. N. A**, 7: 503-25, 1993.

HILL GASTON, J.S., LILICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 17: 219-39, 2003.

HU, P., JIN, L., BAILLIE, T.A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. **J Pharmacol Exp Ther**, 281: 611-7, 1997.

ISAAC-RENTON, J., MOOREHEAD, W., ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. **Appl. Environ. Microbiol**, 62: 47-54, 1996.

ISAAC-RENTON, J.L., CORDEIRO, C., SARAFIS, K., SHAHRIARI, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. **J Infect Dis**, 167: 431-40, 1993.

JARROLL, E.L., SENER, K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. **Drug Resist Updat**, 6: 239-46, 2003.

JIN, L., DAVIS, M.R., HU, P., BAILLIE, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. **Chem Res Toxicol**, 7: 526-33, 1994.

JOHANSSON, B., PETERSEN, E.N., ARNOLD, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethylthiocarbamic acid methyl ester. **Biochem Pharmacol**, 38: 1053-9, 1989.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404, 1982.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. **J Infect Dis**, 140: 984-8, 1979.

KATIYAR, S.K., GORDON, V.R., MCLAUGHLIN, G.L., EDLIND, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, 38: 2086-90, 1994.

KATTENBACH, W.M., PIMENTA, P.F., DE SOUZA, W., PINTO DA SILVA, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res**, 77: 651-8, 1991.

KAVOUSHI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, 28: 19-23, 1979.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 77: 487-88, 1983.

Krulewitch, C.J. An unexpected adverse drug effect. **J Midwifery Womens Health**, 48: 67-8, 2003.

KUŹMICKI, R., JESKE, J. Observations of the efficacy of ornidazole (Tiberall La Roche) in treatment of giardiasis. **Wiad Parazytol**, 40: 65-8, 1994.

LANFREDI-RANGEL, A., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 85: 951-5, 1999.

- LANFREDI-RANGEL, A., KATTENBACH, W.M., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 245-51, 1999.
- LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH, W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol**, 123: 225-35, 1998.
- LEITSCH, D., KOLARICH, D., WILSON, I.B., ALTMANN, F., DUCHÊNE, M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol**, 5: 211, 2007.
- LEMÉE, V., ZAHARIA, I., NEVEZ, G., RABODONIRINA, M., BRASSEUR, P., BALLEZ, J.J., FAVENNEC, L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **J Antimicrob Chemother**, 46: 819-21, 2000.
- LEVI, G.C., DE AVILA, C.A., NETO, V.A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 19: 422-4, 1977.
- LI, L., WANG, C.C. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Mol Microbiol**, 59: 202-11, 2006.
- LILL, R., KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, 25: 352-6, 2000.
- LILL, J.S., MAYS, D.C., LIPSKY, J.J. S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. **Xenobiotica**, 26: 1025-33, 1996.
- LINDMARK, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. **Exp Parasitol**, 65: 141-7, 1988.
- LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 10: 476-82, 1976.
- LINSTEAD, D.J., BRADLEY, S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 125-33, 1988.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., MITCHELL, A., HUGHES, M.N., WADLEY, R.B., EDWARDS, M.R. Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **J Appl Microbiol**, 5: 576-83, 2003.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., WADLEY, R., RALPHS, J.R., HANN, A.C., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. **Microbiology**, 148: 1349-54, 2002.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., BIAGINI, G.A., WADLEY, R.B., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, 146 12: 3109-18, 2000.

LO, H., REEVES, R.E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 2: 23-30, 1980.

LOEWENSON, R., MASON, P.R., PATTERSON, B.A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. **Ann Trop Paediatr**, 6: 73-8, 1986.

LOO, T.W., CLARKE, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. **J Natl Cancer Inst**, 7: 898-902, 2000.

LÓPEZ NIGRO, M.M., PALERMO, A.M., MUDRY, M.D., CARBALLO, M.A. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. **Toxicol In Vitro**, 17: 35-40, 2003.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61: 294-304, 1997.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., BYRD, L.G., NASH, T.E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 23: 7628-33, 1996.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem**, 8: 29307-13, 1995a.

LUJÁN, H.D., MAROTTA, A., MOWATT, M.R., SCIAKY, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., NASH, T.E. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**, 3: 4612-8, 1995b.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., WU, J.J., LU, Y., LEES, A., CHANCE, M.R., NASH, T.E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. **J Biol Chem**, 9: 13807-13, 1995c.

LUJÁN, H.D., NASH, T.E. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. **J Eukaryot Microbiol**, 41: 169-75, 1994.

MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 161-4, 1998.

- MACHADO, R.C., MARCARI, E.L., DE FÁTIMA, S., CRISTANTE, V., CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíase em crianças de crèches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Brás. Méd. Trop**, 32: 697-704, 1999.
- MADAN, A., PARKINSON, A., FAIMAN, M.D. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. **Drug Metab Dispos**, 23:1153-62, 1995.
- MAJID, D.S., NISHIYAMA, A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. **Hypertension**, 39: 293-7, 2002.
- MALMSTRÖM, B.G. Enzymology of oxygen. **Annu Rev Biochem**, 51: 21-59, 1982.
- MEHLOTRA, R.K., TEKWANI, B.L. Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Microbes Infect**, 1: 385-94, 1999.
- MORGAN, U.M., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 328-31, 1993.
- MÜLLER, N., VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**, 35: 1339-47, 2005.
- MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem Pharmacol**, 1; 35: 37-41, 1986.
- MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, 93: 165-71, 1983.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I., QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, 35: 133-41, 2002.
- NASH, T.E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 45: 585-90, 2002.
- NASH, T., RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1488-92, 1998.
- NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop Med Int Health**, 6: 624-34, 2001.
- OBERHUBER, G., VOGELSANG, H., STOLTE, M., MUTHENTHALER, S., KUMMER, A.J., RADASZKIEWICZ, T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. **Am J Pathol**, 148: 1351-7, 1996.

OLNESS, K. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. **J Dev Behav Pediatr**, 24: 120-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Foodborne Diseases**, 2002. <disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em out, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The World Health Report**, Geneva, 1996

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R.P., DURLACHER, R., DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 621-5, 2001.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin Infect Dis**, 25: 545-9, 1997.

PAGET, T.A., RAYNOR, M.H., SHIPP, D.W., LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 63-7,

PAGET, T.A., JARROLL, E.L., MANNING, P., LINDMARK, D.G., LLOYD, D. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol**, 135: 145-54, 1989.

PILON-SMITS, E.A., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T., PILON, M. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. **Plant Physiol**, 130: 1309-18, 2002.

PIMENTEL, D., COOPERSTEIN, S., RANDELL, H., FILIBERTO, D., SORRENTINO, S., KAYE, B., NICKLIN, C., YAGI, J., BRIAN, J., O'HERN, J., HABAS A., WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, 35: 653-668, 2007.

PRITSOS, C.A., KEYES, S.R., SARTORELLI, A.C. Effect of the superoxide dismutase inhibitor, diethyldithiocarbamate, on the cytotoxicity of mitomycin antibiotics. **Cancer Biochem Biophys**, 10: 289-98, 1989.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, 90: 19-39, 2003.

RAIPULIS, J., TOMA, M.M., SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **Int J Food Microbiol**, 25: 343-7, 2005.

REIN, A., OTT, D.E., MIRRO, J., ARTHUR, L.O., RICE, W.G., HENDERSON, L.E. Suppression of retroviral replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. **Leukemia**, 11: 106-8, 1997.

REINER, D.S., MCCAFFERY, M., GILLIN, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol**, 53: 142-53, 1990.

RIVAS, L., MURZA, A., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Interaction of anti-malarial drug quinacrine with nucleic acids of variable sequence studied by spectroscopic methods. **J Biomol Struct Dyn**, 18: 371-83, 2000.

ROE, F.J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surgery**, 93: 158-64, 1983.

SAMARAWICKREMA, N.A., BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., THAMMAPALERD, N., UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother**, 40: 833-40, 1997.

SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 43: 1533-41, 1999.

SAUNA, Z.E., SHUKLA, S., AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol Biosyst**, 1: 127-34, 2005.

SAUNA, Z.E., NANDIGAMA, K., AMBUDKAR, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. **J Biol Chem**, 19: 48855-64, 2004.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, 22: 203-8, 2006.

SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, 4: 1749-60, 2007.

SCHMIDT, H.L., STÖCKLEIN, W., DANZER, J., KIRCH, P., LIMBACH, B. Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. **Eur J Biochem**, 1: 149-55, 1986.

SCULLY, B.E. Metronidazole. **Méd. Clin. North Am**, 72: 613-21, 1988.

SHINTANI, T., KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, 5: 990-5, 2004.

SLAVIN, I., SAURA, A., CARRANZA, P.G., TOUZ, M.C., NORES, M.J., LUJÁN, H.D. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 122: 95-8, 2002.

SMITH, N.C., BRYANT, C., BOREHAM, P.F. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 18: 991-7, 1988.

STANTON, T.B., JENSEN, N.S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **J Bacteriol**, 175: 2980-7, 1993.

STOCKIS, A., DE BRUYN, S., GENGLER, C., ROSILLON, D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 40: 221-7, 2002.

STROMME, J.H. Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. **Biochem Pharmacol**, 12: 705-15, 1963.

SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., DELGADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MÜLLER, M., TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13: 10368-73, 2004.

SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 22: 2156-61, 2007.

SVÄRD, S.G., MENG, T.C., HETSKO, M.L., MCCAFFERY, J.M., GILLIN, F.D. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 30: 979-89, 1998.

TACHEZY, J., SÁNCHEZ, L.B., MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol Biol Evol**, 18: 1919-28, 2001.

TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.

TÉLLEZ, A., PALM, D., WEILAND, M., ALEMÁN, J., WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E., SVÄRD, S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. **Parasite Immunol**, 27: 163-9, 2005.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**, 9: 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, 32: 493-6, 2002.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infections disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol**, 30: 1259-1267, 2000.

THOMPSON, S.C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J Paediatr Child Health**, 30: 202-9, 1994.

THOMPSON, R.C.A, REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, 32: 71-160, 1993.

TONKIN, E.G., VALENTINE, H.L., ZIMMERMAN, L.J., VALENTINE, W.M. Parenteral N,N-diethylthiocarbamate produces segmental demyelination in the rat that is not dependent on cysteine carbamylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1: 139-50, 2003.

TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, 56: 173-94, 1994.

UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, 14: 150-64, 2001a.

UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Ant. Ag. Chemoth**, 45: 1810-14, 2001b.

UPCROFT, P., EDWARDS, R.M., UPCROFT, J.A., BROWN, D.M. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

UPCROFT, J., UPCROFT, P. My favorite cell: *Giardia*. **Bioessays**, 20: 256-63, 1998.

UPCROFT, J.A., CAMPBELL, R.W., UPCROFT, P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. **Parasitology**, 112: 309-13, 1996.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol Today**, 9: 187-90, 1993.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., BOREHAM, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 20: 489-96, 1990.

VON ALLMEN, N., BIENZ, M., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Experimental infections of neonatal mice with cysts of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. **Infect Immun**, 72: 4763-71, 2004.

WASSMANN, C., HELLBERG, A., TANNICH, E., BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **J Biol Chem**, 10: 26051-6, 1999.

WEBSTER, B.H. Furazolidone in the treatment of giardiasis. **Am J Dig Dis**, 5: 618-22, 1960.

WEINBACH, E.C., CLAGGETT, C.E., KEISTER, D.B., DIAMOND, L.S., KON, H. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. **J Parasitol**, 66: 347-50, 1980.

WOLFE, M.S. Giardiasis. **N Engl J Med**, 9: 319-21, 1978.

VOOGD, C.E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, 86: 243-77, 1981.

WOO, P., PANAYI, G.S. Reactive arthritis due to infestation with *Giardia lamblia*. **J Rheumatol**, 11: 719, 1984.

WOOD, Z.A., SCHRODER, E. ROBIN HARRIS, J., POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, 28: 32-40, 2003.

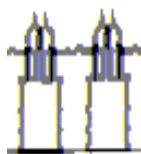
WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, 2: 529-41, 2003.

WRIGHT, C. 4TH., VAFIER, J.A., LAKE, C.R. Disulfiram-induced fulminating hepatitis: guidelines for liver-panel monitoring. **J Clin Psychiatry**, 49: 430-4, 1988.

XIE, Z., KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9: 1102-9, 2007.

YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 281: 30299-304, 2006.

ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop Med Int Health**, 2: 63-82, 1997.



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção
do grau de Mestre.

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A599e Anjos, Karla Graziela Santana dos
Efeitos do dietilditiocarbamato em trofozoítos de *giardia lamblia*: uma nova
ferramenta na terapia contra a giardíase [manuscrito] / Karla Graziela Santana dos. -
2008.
59 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório de Biomorfologia
Parasitária.

1. *Giardia Lamblia*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dietilditiocarbamato. T. I. Título.

CDU 616.995.132:615.32

AGRADECIMENTOS

Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Adriana Lanfredi Rangel

Primeiramente, pela amizade. Sua orientação na bancada foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho. Meu carinho por você é do tamanho do seu coração.

Msc. Cláudio Pereira Figueira

Pela amizade, incentivo e por muitas vezes me ajudar na hora do “sufoco”.

Glória Maria Maranhão Sweet

Por me acolher como uma mãe durante a realização deste trabalho. Sei que seremos eternas amigas!

Msc. Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Brandão

Pela amizade, companheirismo e apoio dado nos momentos difíceis.

Msc. Rafael Gomes, Diego Menezes e Alene Vanessa

Pelas discussões sobre estresse oxidativo e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Elizabeth Mota Costa

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

Elisângela Sodré

Pela amizade e excelente convivência.

Síntia Sacramento, Gustavo Miranda, Antônio Fávero e Edgard Neto

Aos giardólogos e amebólogos, pelo companheirismo e apoio durante todo este tempo na bancada.

Ana Lúcia Costa, Angélica Lacerda, Danielle Anjos, Daniel de Abreu Silva, Rafael Costa,

Thiara Monteiro, Samanta Alexandrino, Fernanda Bomfim e Lourdes Neta

Pela ótima convivência no laboratório.

Msc. Mateus Santos de Sá

Pelo apoio com o experimento de citotoxicidade em linfócitos.

Dr. Jorge Clarêncio

Pelo apoio dado na citometria de fluxo.

Taise Coutinho Caíres

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo suporte dado nas pesquisas.

Todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

Todos os professores e colegas do Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa de 2006

Pelos ensinamentos e amizade.

Todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Minha família (Carlos, Luiza e Vinícius) e meu noivo (Ricardo)

Por vocês existirem! Amo vocês, por inteiro!

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

Aquilo que todos os dias seria limite para nós é destinado a se tornar grande como o olhar de Nossa Senhora. Maria entendia que o conteúdo de cada condição humana desenvolve e realiza o desígnio de um Outro: não o desígnio do próprio coração, mas o do coração de Deus.

As dores, assim como a vida, certamente não lhes faltarão, mas vocês viverão a vida como um caminho; mesmo quando o caminho for fatigante, será a descoberta de um bem realmente grande.

Luigi Giussani

RESUMO

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, onde é exposto a diferentes concentrações de oxigênio. Apesar do metabolismo fermentativo, trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio e mecanismos de detoxificação são requeridos. Desprovido de glutatona, *Giardia* expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína (CRP, também conhecidas como proteínas variantes de superfície ou VSP), como defesa antioxidante. Este mecanismo envolve ciclagem redox para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido e proteção contra o estresse oxidativo. Neste contexto, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem compreender uma poderosa estratégia quimioterápica contra a giardíase. Neste estudo, nós analisamos os efeitos do dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor de superóxido dismutase (SOD), na proliferação do parasito, expressão de tióis totais, lipoperoxidação, produção de radicais livres e arquitetura celular. DETC inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao metronidazol e induziu a peroxidação de membranas neste parasito, possivelmente pelo aumento de espécies reativas. Alterações ultraestruturais também foram observadas neste protozoário. Células tratadas com DETC apresentaram alto grau de extração citoplasmática, além de estruturas indicativas de autofagia. As vesículas periféricas também se encontravam maiores, sugerindo confluência. Estes efeitos são independentes de SOD, já que *Giardia* não apresenta esta enzima. Detecção de grupos tiol com a sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA) foram significativamente moduladas negativamente pelo DETC. Estes dados nos indicam que DETC aumenta o estresse oxidativo em trofozoítos de *Giardia lamblia* pela reação com grupos tiol.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, dietilditiocarbamato, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The microaerophilic protozoan *Giardia lamblia* inhabits the upper small intestine mucosa of vertebrate hosts, where it is exposed to different concentrations of oxygen. Despite the fermentative metabolism, *Giardia* trophozoites consume O₂ and produce oxygen free radicals and therefore mechanism for detoxification are required. Devoid of glutathione, *Giardia* express high concentrations of cystein-rich proteins (CRP, also known as variable surface protein or VSP), as an antioxidant defense. This mechanism involves redox cycling for maintenance of a reduced intracellular environment and protection from oxidative stress. In this regard, substances that interfere in the antioxidant response of this protozoan could comprise a powerful chemotherapeutic strategy for *Giardia lamblia* infection. Here, we analyzed the effects of DETC, a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, on parasite proliferation, thiol expression, lipid peroxidation, free radicals detection and cell architecture. DETC inhibited parasite proliferation at levels similar to metronidazole and induced peroxidation of membrane, possibly by the increase of reactive species. Ultrastructural alteration were also observed. Since this protozoan is devoid of SOD, here present data indicate SOD-independ DETC effects. Thiol groups detection with the fluorescent probe *o*-phthaldialdehyde (OPA). Cells treated with DETC displayed washed out cytoplasm and structures indicative of autophagy. The peripheral vesicles also had an increased volume, presumably caused by homophilic fusion. Taken together these data indicate that DETC enhance the oxidative stress in *Giardia* trophozoites by reacting with thiol groups.

Keywords: Giardia lamblia, diethyldithiocarbamate, oxidative stress.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	05
Figura 2	Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	06
Figura 3	Trofozoíto de <i>Giardia</i> em seção transversal.....	09
Figura 4	Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.....	24
Figura 5	Avaliação do possível sinérgico do DETC e metronidazol em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	25
Figura 6	Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.....	27
Figura 7	Análise da expressão de tióis livres em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8	Quantificação dos grupos sulfidríla em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Figura 9	Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia</i> em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 10	Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	32
Figura 11	Microscopia de fluorescência (A, C, E) e contraste de fase (B, D, F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 12	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	36
Figura 13	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> tratados com DETC.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Ceará
CO ₂	Dióxido de carbono
CRPs	Proteínas ricas em cisteína
Cu	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT-diaforase	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
DTNB	5,5'- ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico)
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ DCFDA	5'- (6')- carboxi, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulina A
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Me	Grupamento metil
Mtz	Metronidazol
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
S	Enxofre

SH	Grupo sulfidrina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido dismutase
SP	São Paulo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VSPs	Proteínas variantes de superfície
<i>Zn</i>	<i>Zinco</i>

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A giardíase.....	01
1.2. A giardíase no Brasil.....	02
1.3. Ciclo biológico.....	03
1.4. O trofozoíto.....	07
1.5. Mecanismos de detoxificação de espécies reativas em <i>Giardia</i>	10
1.6. Tratamento da giardíase.....	11
1.6.1. Nitroimidazóis.....	11
1.6.2. Quinacrina.....	13
1.6.3. Furazolidona.....	14
1.6.4. Benzimidazóis.....	14
1.6.5. Paromicina.....	15
1.6.6. Nitazoxanida.....	15
1.6.7. Bacitracina complexada a sais de zinco.....	16
1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas.....	16
1.7. Dissulfiram: novos potenciais terapêuticos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19

3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	20
4.3. Ensaio de inibição.....	20
4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	20
4.5. Detecção de tióis totais.....	21
4.6. Lipoperoxidação.....	21
4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas.....	21
4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol.....	22
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	22
4.10. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	23
5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	25
5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i>	26
5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	28
5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC.....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GIARDÍASE

A Giardíase é uma enteroparasitose causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Espécies deste gênero infestam mais de 40 espécies de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2002; Appelbee *et al.*, 2005), que podem agir como reservatório para cepas patogênicas em humanos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma cística infectante que pode sobreviver no ambiente por meses e a trofozoíta, que prolifera intensamente na porção anterior do intestino (Adam, 2001). As manifestações clínicas da doença são diarreia aguda ou crônica (eventualmente esteatorréia), desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller & Von Allmen, 2005; Gascón, 2006). Artrite reativa também tem sido associada com infestações entéricas por *Giardia lamblia* (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), bem como o status nutricional afetando função cognitiva e desenvolvimento escolar em crianças pela prevalência de doenças infecciosas intestinais (Olness, 2003).

A distribuição da giardíase é mundial, sendo a parasitose intestinal mais comum em países desenvolvidos, com taxas de detecção entre 2-5% e, 20-30% em nações em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 1996 que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tinham sintomas de giardíase com cerca de 500.000 novos casos por ano, especialmente entre crianças. Em 2004, a giardíase foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido a sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002).

Atualmente as infecções por *G. lamblia* são controladas por drogas, sendo as mais efetivas as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 1998). Casos de resistência clínica são relatados na literatura (Townson, 1994; Farthing, 1996), com taxas de recorrência acima de 90% (Zaat *et al.*, 1997). Além disso, o metronidazol exibe potencial carcinogênico para humanos (Bendesky *et al.*,

2002). Desta forma, a identificação de novas vias parasito-específicas e desenvolvimento de novas drogas é necessário para o tratamento da giardíase.

No lúmen intestinal do hospedeiro vertebrado, *Giardia* é exposta a diferentes concentrações de oxigênio (Biagini *et al.*, 2001). Apesar do metabolismo fermentativo, *Giardia* consome O₂, produzindo radicais livres de oxigênio e a resposta imune também pode usar espécies oxidativas (Fernandes & Assreuy, 1997). Desta forma, mecanismos de detoxificação são requeridos (Brown *et al.*, 1995). Trofozoítos de *Giardia* são cobertos por proteínas ricas em cisteína (CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície), envolvidas na proteção do parasito contra os efeitos letais do oxigênio (Mehlotra & Tekwani, 1999). Além disso, estas proteínas estão associadas à resistência a proteases e à variação antigênica, sendo identificados cerca de 150 genes diferentes que codificam para as CRPs em *G. lamblia* (Nash, 2002). A enzima dissulfeto redutase está presente em *Giardia*, conferindo um balanço redox dissulfeto intracelular, ressaltando a importância da cisteína neste parasito na resposta ao estresse oxidativo. A cisteína é descrita como um fator de crescimento essencial para a *Giardia*, o que pode ser verificado no cultivo axênico (Luján & Nash, 1994; Mehlotra & Tekwani, 1999). Nesse sentido, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem constituir uma poderosa estratégia quimioterápica no parasitismo por *Giardia lamblia*.

1.2. A GIARDÍASE NO BRASIL

No Brasil, sua ocorrência é em grande parte desconhecida - principalmente em adultos. Prevalências relatadas de giardíase em crianças brasileiras variam de 14,6% em populações específicas a 78,3% em creches e crianças em idade escolar (Machado & Costa-Cruz, 1998; da Costa-Macedo *et al.*, 1998; Orlandi *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo sobre a giardíase foi realizado em Gonçalves Dias no município de Fortaleza (CE), acompanhando crianças recém-nascidas até os 4 anos de idade (Newman *et al.*, 2001). Dentre as 157 crianças, 43 (27,4%) encontravam-se infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 46% apresentaram recorrências ou recidivas. As crianças que apresentavam sintomas tiveram valores reduzidos de peso e altura, quando avaliados física e nutricionalmente.

No Hospital da Universidade Federal da Bahia, foi realizado um estudo detalhado sobre a prevalência de parasitos intestinais em 365 pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Cerca de 4,9% destes pacientes apresentaram infestação por *Giardia lamblia*, demonstrando uma prevalência significativamente aumentada quando comparada ao grupo que não apresentava a SIDA (2,4%). O grupo controle foi composto por 5243 pacientes (Feitosa *et al.*, 2001).

Machado *et al.* (1999), em um estudo sobre a incidência de giardíase em crianças de creches e escolas de ensino fundamental e médio, no município de Mirassol (SP), confirmam os dados obtidos por outros autores (Wolfe, 1978; Cardoso *et al.*, 1995; Guimarães & Sogayar, 1995) que tanto a idade (2 a 6 anos) quanto o nível sócio-econômico (até 6 salários mínimos) são fatores de risco determinantes da giardíase. Isto se dá pelo fato do nível sócio-econômico e grau de escolaridade mais baixos influenciarem as condições de higiene pessoal e cuidados com alimentos e água (Machado *et al.*, 1999). Um estudo prospectivo de doenças diarréicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para aquisição de giardíase (Guerrant *et al.*, 1983).

Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) demonstraram haver associação entre má nutrição (desnutrição energético-protéica) e o parasitismo por *Giardia lamblia* através da observação de redução significativa dos valores de peso em relação à idade e altura. Outros estudos demonstraram a relação entre infestações por *Giardia* e subnutrição na África (Loewenson *et al.*, 1986) e Ásia (Al-mekhlafi *et al.*, 2005). Ertan *et al.* (2002) também encontraram associação entre baixos níveis séricos de ferro e zinco e a giardíase.

O decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasito (Wolfe, 1978; Hill, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1999) e também com a melhoria dos hábitos de higiene pessoal associada ao aumento da idade.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

A infestação por *Giardia* ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados por fezes contendo cistos (Fig. 1), como ocorre freqüentemente em creches e

orfanatos onde as condições de higiene podem estar comprometidas (Thompson, 2004). O encistamento ocorre no trato digestório, auxiliado pelo baixo pH e proteases estomacais (Adam, 2001), dando origem ao excizoíto (Bernander *et al.*, 2001). O excizoíto é oval, possui oito flagelos, quatro núcleos e metabolismo intermediário entre o trofozoíto e o cisto (Fig. 2). Possui uma ploidia total de 16N, sofrendo divisão celular por duas vezes sem replicação do DNA, gerando quatro trofozoítos com uma ploidia de 4N (Bernander *et al.*, 2001). Estes últimos irão se dividir por fissão binária e a adesão ao epitélio intestinal se dá através do disco ventral (Elmendorf *et al.*, 2003).

O encistamento ocorre com a passagem dos trofozoítos pelo lúmen intestinal, onde eles se soltam e são expostos na região posterior do intestino a um pH mais alcalino (em torno de 7,8), ácidos graxos e sais biliares (Gillin *et al.*, 1988). A ausência de lipoproteínas também demonstrou ser um fator de promoção do encistamento, o que pôde ser revertido pela adição de colesterol (Luján *et al.*, 1996).

O processo de formação da parede cística envolve a ativação dos genes de encistamento em resposta a estímulos e posterior síntese de proteínas que constituirão a parede cística (Lujan *et al.*, 1995a; 1997), as quais são transportadas para a membrana plasmática através das vesículas específicas de encistamento (ESVs) (Reiner *et al.*, 1990; Benchimol, 2004). Durante o tráfego destas proteínas, é provável que haja a participação das vesículas periféricas na maturação do material a ser secretado (Touz *et al.*, 2002a).

O potencial zoonótico desta doença tem sido considerado na literatura como um fator de relevância na transmissão peridomiciliar de felídeos e canídeos (Thompson, 2000).

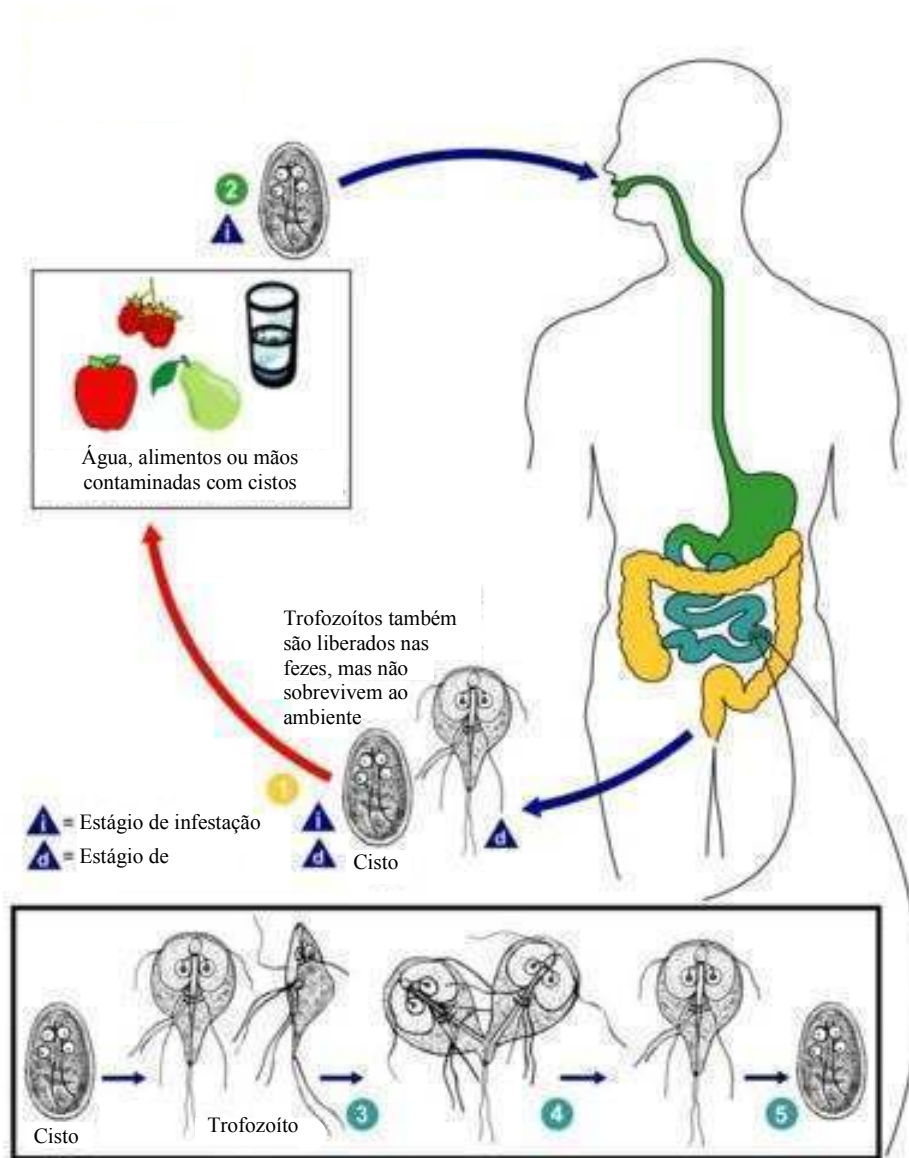


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Cistos e trofozoítos eliminados através das fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Trofozoítos em processo de divisão. (5) Encistamento. Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc-gif>.

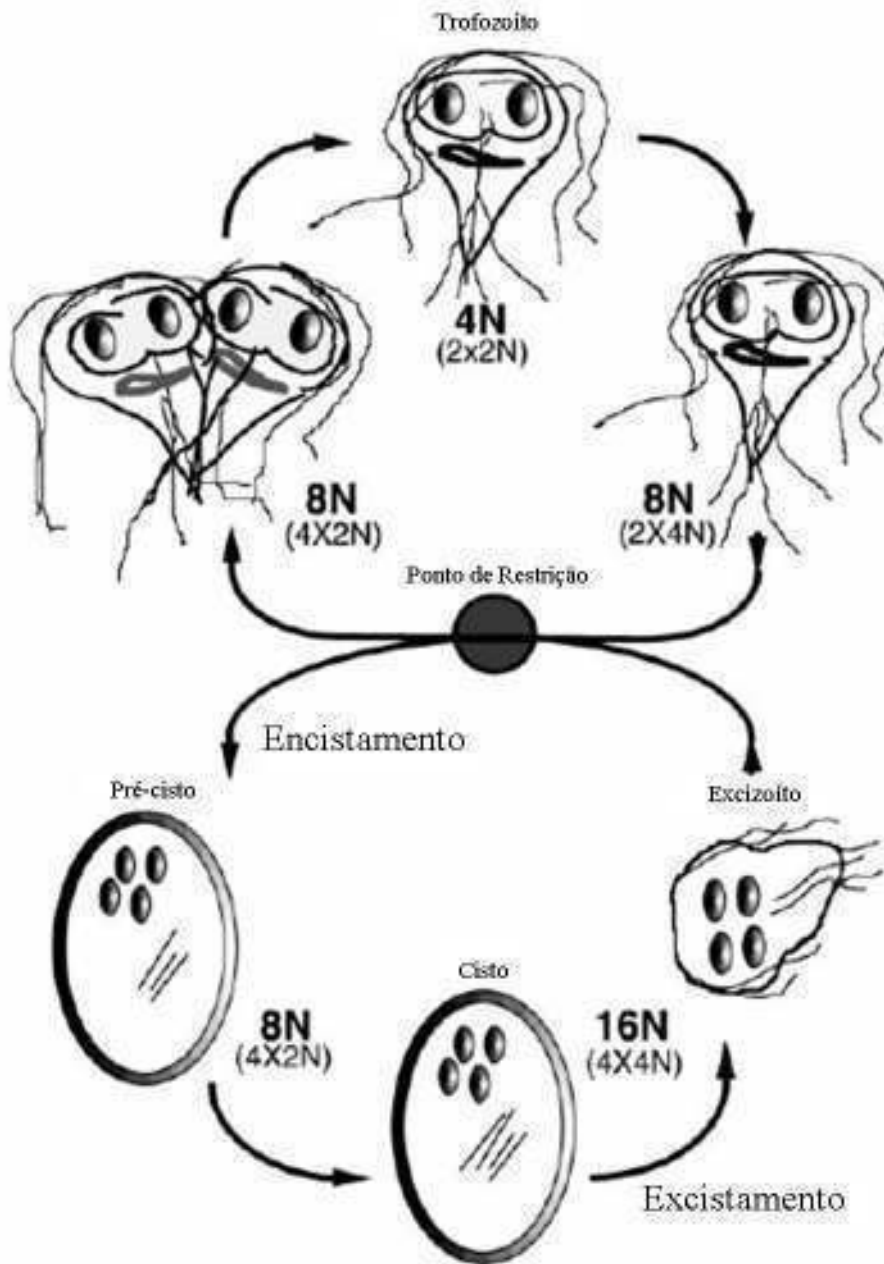


Figura 2. Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Durante o crescimento vegetativo, a ploidia varia entre $4N$ e $8N$. Após a estimulação do encistamento e concomitante formação da parede cística, o núcleo se divide, resultando em uma célula tetranucleada com ploidia de $8N$. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros, com uma ploidia celular de $16N$. O excistamento resulta na liberação de um excizoíto, que se divide duas vezes para formar quatro trofozoítos, contendo cada um dois núcleos diplóides. Adaptado de Bernander *et al.*, 2001.

1.4. O TROFOZOÍTO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* são piriformes, possuindo cerca de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, látero-posterior, caudal e ventral), sendo que os axonemas caudais são acompanhados pelo corpo funis e um disco adesivo é responsável pela adesão do trofozoíto às microvilosidades intestinais (Fig.3). Possui dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente e simétricos ao eixo longitudinal (Revisto por Adam, 2001). Ribossomos e grânulos de glicogênio se apresentam por todo o citoplasma e o retículo endoplasmático se projeta da região perinuclear até a região das vesículas periféricas, na região dorsal da célula (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). O complexo de Golgi torna-se visível em trofozoítos em processo de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999), mas não tem sido confirmada a presença em trofozoítos vegetativos (Gillin *et al.*, 1996). Apesar disso, mecanismos de transporte de proteínas estão presentes em *Giardia*, semelhantes aos que ocorrem na rede *trans* do aparelho de Golgi na maioria das células complexas (Gu *et al.*, 2001). Algumas evidências sugerem que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar organela(s) com função típica de Golgi, apesar de não ter sua aparência. NBD-ceramida, um marcador do complexo de Golgi em células de mamíferos, marcou uma estrutura perinuclear tanto em trofozoítos vegetativos, quanto em células em processo de encistamento (Luján *et al.*, 1995b; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

As vesículas periféricas são caracterizadas pela acidez dos seus compartimentos, como demonstrado através da incorporação de laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), bem como pela concentração de ferritina exógena e lucifer yellow, sugerindo seu papel na endocitose (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Os vacúolos contêm uma variedade de enzimas com atividade hidrolásica, como por exemplo, a fosfatase ácida, proteases e RNase, indicando suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). É provável que ocorra maturação destes vacúolos de endossoma inicial, tardio até lisossomo, processo que pode estar funcionalmente associado ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Apesar de *Giardia* não possuir mitocôndria, a presença de membranas especializadas com função transportadora de elétrons tem sido detectada (Lloyd *et al.*, 2002). Conhecidas como mitossomos, estas organelas são responsáveis pela produção de H₂ e apresentam maquinaria protéica para biossíntese de centros Fe-S (Tachezy *et al.*, 2001). Em eucariotos, este processo

ocorre exclusivamente em organelas limitadas por dupla membrana, como mitocôndria (Lill & Kispal, 2000), hidrogenossomos (Sutak *et al.*, 2004) e cloroplastos (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Peroxissomos, que são organelas citoplasmáticas responsáveis por reações oxidativas, estão ausentes neste parasito.

Os proteassomos de *Giardia* apresentam muitas similaridades com os de Archaea (Emmerlich *et al.*, 1999). Além disso, proteínas alvo de proteassomos são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar presente neste protozoário como um gene de cópia única, o que o distingue dos outros eucariotos, que possuem múltiplas cópias desse gene (Emmerlich *et al.*, 2001).

Cerca de 30% dos trofozoítos apresentam uma protrusão ventral que emerge da região central do disco adesivo. A observação desta estrutura revelou a presença de cisternas de retículo endoplasmático, muitas vezes formando membranas concêntricas envolvendo quantidades variadas de grânulos de glicogênio, possivelmente em processo de degradação, além de vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

A flange ventrolateral é uma projeção citoplasmática maleável, semelhante a lamelipódios, localizada entre as regiões de superfície ventral e dorsal e que se ajusta as microvilosidades das células epiteliais durante a adesão (revisto por Adam, 2001).

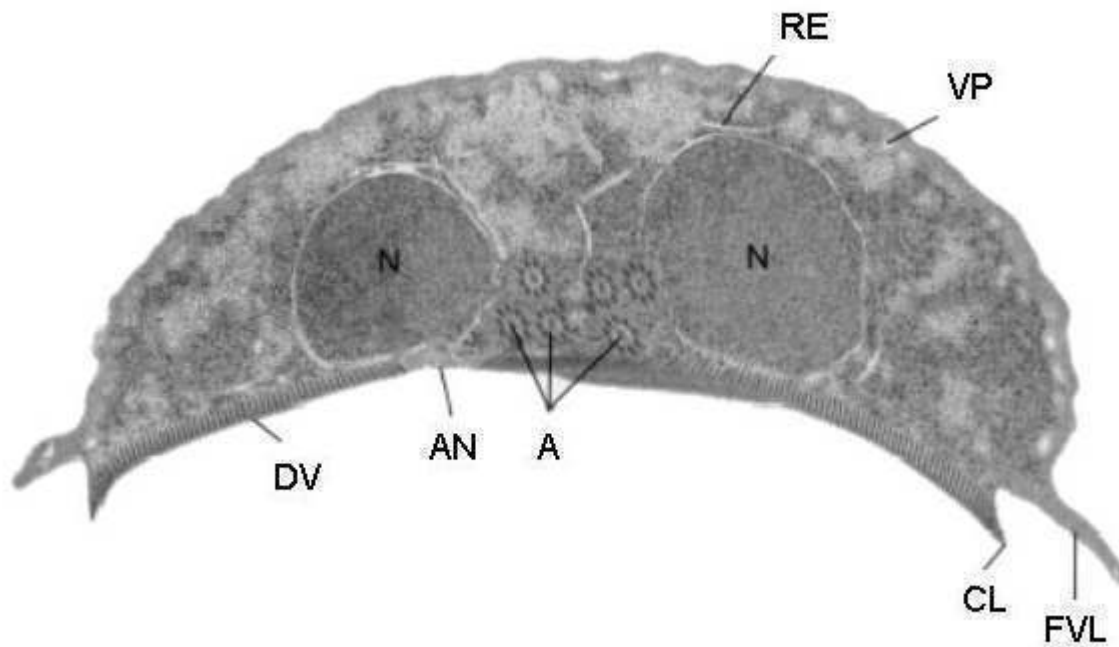


Figura 3. Trofozoíto de *Giardia* em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Adaptado de Adam, 2001.

1.5. MECANISMOS DE DETOXIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM *Giardia*

Apesar de não possuir mitocôndria, *Giardia* consome oxigênio e os produtos finais do seu metabolismo de glicose são sensíveis às tensões de O₂ presentes no lúmen intestinal. Em um ambiente anaeróbico, etanol, alanina e dióxido de carbono (CO₂) são formados em concentrações equimolares. Contudo, quando o oxigênio é introduzido, o balanço de carbono é radicalmente alterado. A produção de alanina é reduzida em cerca de 90% e a produção de acetato é simultaneamente aumentada em cerca de dez vezes. A concentração de CO₂ é aproximadamente duas vezes aumentada, mas a produção de etanol não é alterada (Paget *et al.*, 1990). A capacidade de respirar de alguns protozoários anaeróbicos sugere que eles são capazes de transferir elétrons ao oxigênio como seu aceptor final. Contudo, seu metabolismo permanece fermentativo, mesmo em condições aeróbicas. A utilização de O₂ por *Giardia lamblia* não é afetada por inibidores de respiração mitocondrial, mas bloqueada por flavo-antagonistas, inibidores de tiol e quelantes de metal (Weinbach *et al.*, 1980), sugerindo que algumas das flavoproteínas, tioproteínas e metaloproteínas podem usar O₂ como aceptor de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio neste parasito.

Os mecanismos de detoxificação de espécies oxidativas neste parasito incluem a atividade citoplasmática de uma oxidase flavina-dependente (NADH oxidase), que reduz tetravalentemente O₂ em H₂O, além de estar envolvida em mecanismos de resistência ao metronidazol de algumas cepas, que expressam altos níveis de atividade desta enzima (Ellis *et al.*, 1993). A susceptibilidade de *Giardia lamblia* ao oxigênio também é justificada pela presença da DT-diaforase, uma enzima que tem sua atividade acompanhada pelo aumento intracelular de peróxido de hidrogênio (Li & Wang, 2006). A NADH peroxidase, localizada na região transmembrana de *Giardia lamblia*, catalisa a formação de água a partir de peróxidos (Brown *et al.*, 1995).

Um importante mecanismo de proteção contra o ambiente hostil ao qual *Giardia* é submetido no intestino está relacionado a um ambiente redutor produzido pelas CRPs, que apresentam de 11 a 12% de cisteína e são expressas em *Giardia lamblia* em concentrações milimolares (Luján & Nash, 1994). A cisteína é o principal tiol de baixo peso molecular neste parasito, mas baixos níveis de sulfito, ácido tioglicólico e coenzima A também foram observados, enquanto que glutatona e seus intermediários não foram detectados (Brown *et al.*, 1993). Além disso, subsequente identificação de uma dissulfeto redutase (semelhante à tioredoxina redutase),

que utiliza cistina como aceptor primário de elétrons em *Giardia*, parece ser o maior sistema de atividade redox tiol-dissulfeto contra o estresse oxidativo neste protozoário (Brown *et al.*, 1996b). Pesquisas em dados de base genômicas em *G. lamblia* revelaram também homólogos de tioredoxinas peroxidases que, se expressadas, podem proteger organismos dos radicais livres de oxigênio pela redução de peróxidos com os elétrons da tioredoxina (Wood *et al.*, 2003).

Algumas das enzimas reconhecidamente envolvidas na detoxificação de radicais livres de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água pela catalase, não estão presentes em *Giardia*, sugerindo a importância dos grupamentos tiol na sobrevivência deste parasito (Brown *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Biagini e colaboradores (2001) descreveram o potencial antioxidante do piruvato em *Giardia*, transformando não enzimaticamente superóxido e peróxido de hidrogênio em acetato e CO₂.

Uma importante estratégia do parasito *G. lamblia* contra a defesa do hospedeiro durante a colonização da mucosa intestinal se dá através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase epitelial, por uma competição pela arginina, utilizada como fonte de energia pelo parasito. O NO apresenta propriedades citostáticas contra *Giardia* e o bloqueio de sua produção, conseqüentemente, permitirá a sua proliferação (Eckmann *et al.*, 2000).

Morte de trofozoítos de *Giardia lamblia* por macrófagos murinos ativados ocorreu rapidamente *in vitro* (Fernandes & Asseruy, 1997), com 60% dos parasitos sendo eliminados em cerca de 2 horas. Um inibidor de NO sintase, *N*-iminoetil-1-ornitina, protegeu os organismos. A extrema sensibilidade deste parasito ao estresse nitrosativo é principalmente devida à interrupção de funções da membrana plasmática, e perda da capacidade do consumo de O₂ em associação com a diminuição da atividade flagelar (Lloyd *et al.*, 2003).

1.6. TRATAMENTO DA GIARDÍASE

1.6.1. Nitroimidazóis

Os agentes da classe dos nitroimidazóis utilizados para tratamento de infecções por *Giardia* incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. O metronidazol foi primeiramente relatado para o tratamento da tricomoníase (Durel *et al.*, 1960), sendo posteriormente indicado para uso terapêutico na giardíase (Darbon *et al.*, 1962). Desde então, a síntese e testes biológicos de outros compostos nitroimidazóis têm sido uma crescente, aumentando o arsenal terapêutico contra protozoários e bactérias anaeróbicas (Scully, 1988; Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 2001a; Harder, 2002). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (Raether & Hänel, 2003).

Dos nitroimidazóis, o mecanismo de ação do metronidazol tem sido o mais amplamente estudado. A ativação da droga se dá através da redução do seu grupo nitro pela piruvato: ferredoxina oxidoredutase (Townson *et al.*, 1994; Samuelson, 1999), e um gradiente favorecendo o transporte intracelular do metronidazol é estabelecido por esta reação de redução. A atividade antimicrobiana deste composto reduzido resulta da reatividade e dismutação de intermediários instáveis, que matam os trofozoítos através da interação com várias moléculas essenciais como o RNA, DNA, proteínas e componentes de membrana, resultando em danos celulares irreversíveis (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988; Freeman *et al.*, 1997). Além destes efeitos, o metronidazol inibe o consumo de O₂ do trofozoíto, por agir como um aceptor de elétrons alternativo (Paget *et al.*, 1989). Apesar de este composto ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, ele se mostra ineficaz contra os cistos, provavelmente pela dificuldade em ultrapassar a barreira imposta pela parede cística (Thompson *et al.*, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do metronidazol incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (Levi *et al.*, 1977; Kavousi, 1979). Além disso, a inibição da aldeído desidrogenase por esta droga pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), pela ingestão de álcool durante o período de tratamento (Gardner & Hill, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos em altas doses por longos períodos tem sido relatado na literatura (Lindmark & Muller, 1976; Voogd, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (Bendesky *et al.*, 2002). O uso prolongado deste fármaco, falhas no tratamento e má conduta terapêutica tem aumentado os níveis de resistência clínica em pacientes parasitados por *Giardia lamblia*. Na França, mais de

20% dos casos de giardíase apresentam algum grau de resistência à droga (Lemeé *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001b).

Evidências clínicas em adultos e pacientes pediátricos têm demonstrado a eficácia e segurança do tinidazol no tratamento contra a giardíase, podendo ser usado em casos onde houve falhas no tratamento com o metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007). Apesar dos efeitos adversos relatados pelo uso deste fármaco, a exemplo de gosto amargo na boca, vertigem e perturbações intestinais, estes não são tão comuns como os causados pela utilização do metronidazol (Jokipii & Jokipii, 1979; 1982).

Um outro derivado dos 5-nitroimidazóis que é uma boa alternativa para o tratamento da giardíase é o ornidazol. Apesar dos poucos estudos realizados, este fármaco apresenta uma excelente eficácia, comparável ao tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1982; Bassily *et al.*, 1987; Kuzmicki & Jeske, 1994). Em um estudo *in vitro*, efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pelo ornidazol em culturas de sangue periférico humano foram sugeridos (López *et al.*, 2003). Apesar disso, efeitos colaterais raramente ocorrem em pacientes que fazem uso deste fármaco via oral (Escobedo & Cimerman, 2007).

O secnidazol também apresenta uma boa eficácia contra a giardíase, sendo rápida e completamente absorvido por via oral. Assim como o tinidazol e o ornidazol, este composto apresenta uma meia-vida longa (17-29 horas), o que permite a administração em dose única com concomitante diminuição dos efeitos colaterais em relação ao metronidazol (Gillis & Wiseman, 1996). Efeitos adversos têm sido relatados, a maioria notavelmente relacionada a distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.2. Quinacrina

A quinacrina é um derivado de acridina que foi primeiro introduzido como agente antimalárico em 1930. Somente em 1937 a eficácia deste composto foi demonstrada contra *Giardia*. Por muitos anos a quinacrina foi a droga de escolha no tratamento da giardíase, sendo substituída na década de 60 pelo metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação deste fármaco no parasito não está completamente elucidado. A diminuição do consumo de oxigênio pela interferência com componentes flavina de enzimas

como a NADH oxidase (Paget *et al.*, 1989) e inibição da síntese de ácidos nucléicos pela ligação ao DNA (Rivas *et al.*, 2000) são proposições feitas para o modo de ação desta droga. Após administração oral, a quinacrina é totalmente absorvida pelo trato intestinal, mesmo em pacientes com diarreia severa. Sua meia-vida é longa, sendo vagarosamente excretado pelos tecidos.

A toxicidade seletiva da quinacrina se deve ao fato de que a taxa de incorporação da droga no parasito é maior do que nas células do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). Este fármaco é eficaz contra cistos e também promove a redução do excistamento *in vitro*. Resistência induzida em culturas por quinacrina tem sido demonstrada, estando relacionada a uma diminuição da taxa de incorporação desta droga pelo protozoário (Upcroft *et al.*, 1996).

Efeitos colaterais deste fármaco incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, gosto amargo na boca e coloração amarelada ou alaranjada na pele e urina (Harris *et al.*, 2001). Outros efeitos relatados são hemólise em pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, psicose tóxica e exacerbação da psoríase (Gardner & Hill, 2001).

1.6.3. Furazolidona

Este derivado de nitrofurano foi descoberto em 1940, mas só em 1960 foi relatada sua atividade contra *Giardia lamblia* (Webster, 1960). Sua eficácia é menor do que a do metronidazol e quinacrina, porém sua grande vantagem consiste em sua formulação líquida, o que facilita a administração desta droga, principalmente em crianças (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação da furazolidona consiste na redução do seu grupo nitro pela NADH oxidase, cujos radicais citotóxicos causam danos aos componentes celulares, incluindo o DNA (Brown *et al.*, 1996a). Resistência está relacionada à diminuição das taxas de incorporação da droga pelo parasito e aumento dos níveis de enzimas com ciclagem tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. Podem também ocorrer reações semelhantes às causadas pelo dissulfiram após ingestão de álcool (Gardner & Hill, 2001). Efeitos mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura decorrentes do uso da furazolidona (Raipulis *et al.*, 2005).

1.6.4 Benzimidazóis

Inicialmente reconhecidos como drogas antihelmínticas, os benzimidazóis possuem um amplo espectro de ação, inclusive contra alguns protozoários (Escobedo & Cimerman, 2007). Dois membros dessa classe são utilizados no tratamento da giardíase, o albendazol e o mebendazol. Eles exercem seus efeitos pela ligação à β -tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e falhas na incorporação de glicose também ocorrem (Gardner & Hill, 2001). Cacopardo *et al.* (1995) demonstraram que a combinação albendazol-metronidazol foi 100% eficaz em portadores de *G. lamblia* resistente ao metronidazol. Uma outra vantagem relacionada ao uso do albendazol é a relativa falta de efeitos colaterais. A OMS recomenda que mulheres em período gestacional só recebam tratamento com albendazol e mebendazol a partir do terceiro mês de gestação (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.5. Paromicina

A paromicina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem sido uma alternativa eficaz e menos tóxica para gestantes infectadas por *Giardia* e em caso de cepas resistentes (Hill, 1993). O mecanismo de ação proposto para este fármaco é através da inibição da síntese protéica, interferindo nas subunidades ribossomais do parasito, que possuem tamanhos e seqüências incomuns (Katiyar *et al.*, 1994).

Após administração oral, pouco da droga é absorvida pela circulação sistêmica, atingindo altas concentrações no intestino. A maior parte da paromicina é excretada nas fezes. Em pessoas com disfunção nos rins, este fármaco pode se acumular e causar toxicidade renal (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.6. Nitazoxanida

A nitazoxanida é um 5-nitrotiazol que possui amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias, protozoários e helmintos. Estudos clínicos e *in vitro* têm confirmado a eficácia da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, no tratamento da giardíase. O mecanismo de ação é semelhante à classe dos 5-nitroimidazóis, através do grupo nitro (Adagu *et al.*, 2002). A absorção e bioviabilidade desta droga são aumentadas pela administração conjunta com alimentos (Stockis *et al.*, 2002). Uma vez fracamente absorvido pelo trato gastrointestinal, dois terços deste fármaco são expelidos pelas fezes e um terço pela urina (Broekhuysen *et al.*, 2000). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais.

1.6.7 Bacitracina complexada a sais de zinco

Este fármaco é composto de dois agentes: a bacitracina, um antibiótico produzido pela cepa Tracy-1 de *Bacillus subtilis*, e zinco, que promove estabilidade a este composto. Efeitos colaterais da bacitracina complexada a sais de zinco foram notados somente em um pequeno número de pacientes e incluem diarreia, náusea e desconforto abdominal. O uso prolongado desta droga causa problemas nefrotóxicos e distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas

O emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inapropriadas, os baixos custos e a facilidade de obtenção de determinados fármacos têm ocasionado resistência e feito com que em muitas partes do mundo, drogas como a cloroquina, penicilina e a meticilina sejam novamente utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Upcroft & Upcroft, 2001a).

Uma recente revisão do grupo dos Upcroft aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento não apenas da giardíase, como também para a amebíase e outras protozooses (Wright *et al.*, 2003).

A busca de novos fármacos para uso no combate a parasitoses intestinais vem sendo considerável. No que concerne a giardíase, diferentes drogas têm sido utilizadas, mas nenhuma é plenamente satisfatória, principalmente pela alta incidência de efeitos colaterais que justificam as contra-indicações e ocorrência significativa de falhas no tratamento. Nesse sentido, é de fundamental importância a realização de novas pesquisas em estratégias terapêuticas para a giardíase, tornando-se uma área de desenvolvimento em potencial nos próximos anos (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.7. DISSULFIRAM: NOVOS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

O dissulfiram, ou tetraetiltiuram dissulfeto, tem sido usado por mais de meio século para terapia de aversão ao álcool, através da inibição da enzima hepática aldeído desidrogenase (ALDH) (Sauna *et al.*, 2005). Sua farmacocinética tem sido extensivamente estudada, sendo considerada pela FDA e OMS uma droga segura e eficaz. Nesta última década numerosos relatos vêm sugerindo a utilização deste fármaco no tratamento do câncer e infecções fúngicas (Sauna *et al.*, 2005). A reversão do fenótipo MDR (Resistência a Múltiplas Drogas) pela inibição dos transportadores ABC, através de sua ligação com um de seus membros, a P-glicoproteína (Pgp) (Loo & Clarke, 2000; Sauna *et al.*, 2004), e seus poucos efeitos colaterais, mesmo em uso prolongado (Brewer, 1984; Chick, 1999; Brar *et al.*, 2004) fazem do dissulfiram uma droga com múltiplos alvos terapêuticos em potencial.

Recentes estudos do mecanismo pelo qual o dissulfiram exerce seus efeitos anti-álcool tem fornecido evidências para a formação de um intermediário reativo que é um potente agente carbamilante para grupos sulfidríla (Madan *et al.*, 1995). No organismo, esta droga é rapidamente e completamente reduzida a dietilditiocarbamato (DETC) (Cobby *et al.*, 1977), um conhecido inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) (Guzik *et al.*, 2005) e que forma conjugados com a *N*-acetilcisteína (NAC) (Hu *et al.*, 1997). O DETC já teve sua atividade relatada para vários protozoários parasitas, a exemplo de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e algumas espécies do gênero *Plasmodium* (Giulivi *et al.*, 1988; Bouma *et al.*, 1998; Deharo *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* possui uma larga distribuição mundial, causando síndrome da má absorção, perturbações intestinais, com dores abdominais, eliminação de fezes diarréicas e eventualmente esteatorréia. Artrite reativa também tem sido relacionada ao parasitismo por *G. Lamblia*. (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003). Vários relatos têm associado a prevalência de doenças infecciosas intestinais e status nutricional afetando ainda mais a função cognitiva, aproveitamento escolar e desenvolvimento físico de crianças (Olness, 2003).

Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, o que aumenta as taxas de prevalência nestes locais, chegando em torno de 30%, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS, 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002). Em 2004, *Giardia* foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido à sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006).

Doenças diarréicas são a causa principal de morbidade na maioria dos países em desenvolvimento (Pimentel *et al.*, 2007). A este respeito, o advento de novas drogas seguras e eficazes na terapia contra a giardíase, aliado a programas preventivos em regiões endêmicas para esta doença, poderiam reduzir consideravelmente os custos com o tratamento (Savioli *et al.*, 2006). Os impactos sócio-econômicos oriundos de políticas que promovem a saúde pública incluem uma melhor formação de recursos humanos, pela melhora do desenvolvimento cognitivo de crianças, com concomitante aumento na geração de postos de trabalho. Por consequência, haveria uma melhora na qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Nosso trabalho tem como objetivo geral o estudo do mecanismo de ação do dietilditiocarbamato (DETC) em trofozoítos de *Giardia lamblia*, objetivando uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais no tratamento contra a giardíase.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinação da suscetibilidade parasitária (IC_{50}) através de ensaios de proliferação.
- 2) Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.
- 3) Avaliação dos danos oxidativos celulares, por quantificação bioquímica da peroxidação lipídica induzida pelo DETC.
- 4) Quantificação colorimétrica de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 5) Análise por microscopia para localização da expressão de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*, através de sonda fluorescente.
- 6) Detecção de radicais livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*, pelo uso de sonda fluorescente.
- 7) Elucidação dos efeitos microbicidas do fármaco por microscopia eletrônica de transmissão, para a observação da ultraestrutura celular do parasito, possivelmente permitindo a compreensão do modo de ação do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2. Cultivo de *Giardia lamblia*

A cepa de *G. lamblia* a ser utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof^o. Dra. Frances D. Gillin, do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB são axenicamente cultivados em tubos cônicos de vidro (aproximadamente 10 mL), em meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina e 10% (volume/volume) de soro bovino inativado a 56°C por uma hora (Keister, 1983), à temperatura de 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 a 72 horas.

O meio TYI-S-33 é preparado com a seguinte composição: 19,5 mg/mL de caseína, 10,5 mg/mL de extrato de levedura, 10 mg/mL de dextrose, 2 mg/mL de cloreto de sódio, 0,6 mg/mL de fosfato de potássio monobásico, 1 mg/mL de fosfato de potássio dibásico, 2 mg/mL de L-cisteína, 1 mg/mL de bile bovina e 0,2 mg/mL de ácido ascórbico. O pH é ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1N. O meio é esterilizado em filtro a vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

4.3. Ensaio de inibição

Inóculos de 1 a 2 x 10⁵ trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DETC e/ou metronidazol, por 24 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Inóculos de 1×10^6 esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e $10 \mu\text{L}$ de [^3H]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de $1 \mu\text{Ci/poço}$, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5. Detecção de tióis totais

Inóculos de 2×10^4 trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em tubos de 15 mL por 60-72 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC e/ou metronidazol. Em seguida as células foram centrifugadas a 500 X g por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM , pH 8,2. A $20 \mu\text{L}$ da amostra foram adicionados $75 \mu\text{L}$ do mesmo tampão, $25 \mu\text{L}$ do reagente DTNB e $400 \mu\text{L}$ de metanol, sendo após centrifugado a 1500 X g por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm .

4.6. Lipoperoxidação

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC e/ou N-acetilcisteína (NAC). Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação a 500 X g por 10 minutos em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após centrifugação, $200 \mu\text{L}$ de 0,1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados a $200 \mu\text{L}$ de células em suspensão e incubados a 100°C por 3 horas. A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida a 532 nm e a absorbância foi comparada ao padrão obtido usando 0.1% TBA e PBS, à proporção de 1:1.

4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca/Mg, pH 7,2 por centrifugação a 500 X g por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo $25 \mu\text{M}$ da sonda 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Molecular

Probes). Após o período de incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes, montados em lâminas e observados ao microscópio de fluorescência.

4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol

Trofozoítos foram fixados por 30 min a 4°C em 1% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Para a adesão dos trofozoítos, as lamínulas foram lavadas com extran neutro, submersas em etanol 70% e secas sem contato manual. Foram colocadas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro e recobertas com solução de 0,1 % de poli-*L*-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Retirado o excesso desta solução, as lamínulas foram secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e, novamente, secas. As células aderidas por 30 minutos às lamínulas foram incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propilgalato e observadas no microscópio de fluorescência.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento com as drogas, as células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio neste tampão. Em seguida os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e infiltrados em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por 48 hs a 60°C, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 400 e contrastados em 5% de acetato de uranila e 15% de citrato de chumbo. As grades são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos estão representados como a média ± desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível

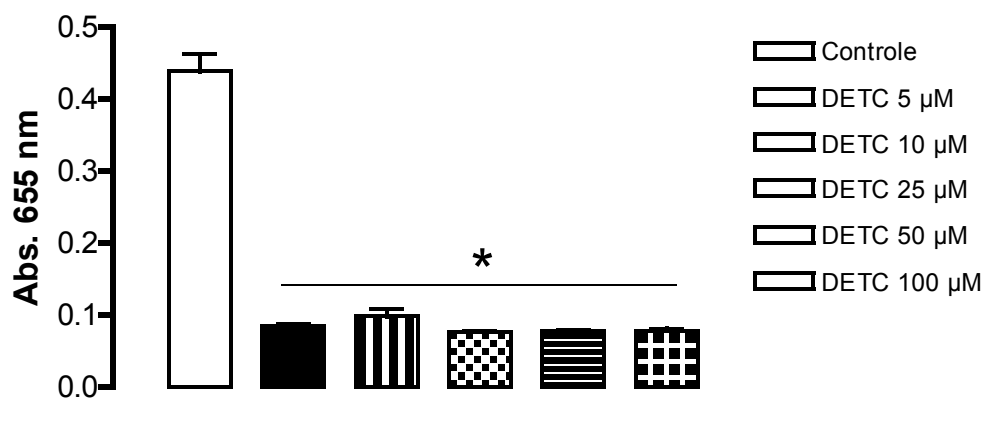
de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de *G. lamblia*

Para avaliar a atividade inibitória do DETC na proliferação celular de *G. lamblia*, nós realizamos experimentos de dose-resposta, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM , por 24 horas. O DETC diminuiu significativamente a proliferação dos trofozoítos, não havendo diferença significativa entre as concentrações utilizadas, presumivelmente por uma ausência de efeito giardicida dose-dependente nestas concentrações (Fig. 4A). O valor de IC_{50} do DETC foi aproximadamente de 2,0 μM , o que demonstra a efetividade do DETC contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, tendo seu efeito comparado ao metronidazol, com valores de IC_{50} em torno de 1,5 μM . Apesar de discreto, aparentemente há uma relação de dose-dependência para o efeito inibitório do metronidazol neste parasito nas concentrações utilizadas (Fig. 4B).

(A)



(B)

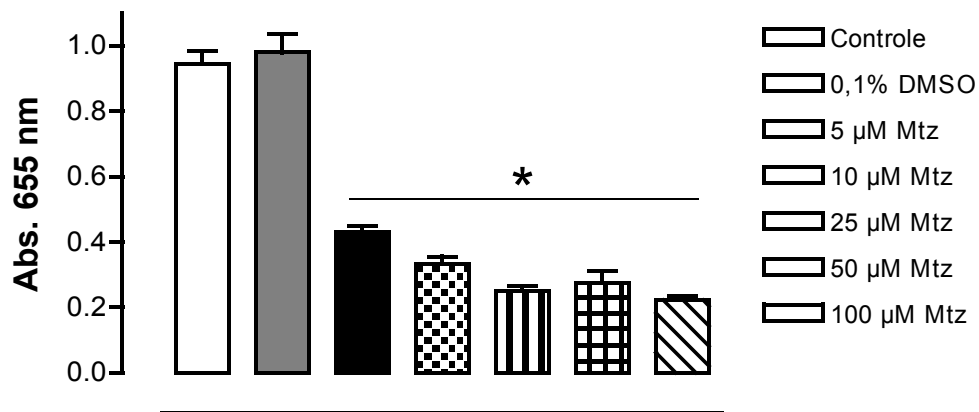


Figura 4. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular. Trofozoítos de *Giardia lamblia* expostos a diferentes concentrações de DETC e metronidazol. (A) Após 24 horas de incubação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com DETC, porém o efeito não foi dose-dependente nas concentrações testadas. (B) Em células tratadas com o metronidazol, observamos uma inibição significativa do crescimento em comparação com as células tratadas com 0,1% de DMSO, havendo uma redução dose-dependente discreta na proliferação entre 5 25 µM de concentração da droga. (*, $p < 0,001$).

5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação da concentração inibitória do DETC e metronidazol neste protozoário, nós avaliamos a associação de ambas as drogas para verificar um possível efeito sinérgico em trofozoítos de *G. lamblia*. Em células tratadas com 1 μM de DETC por 24 horas, não houve uma inibição significativa do crescimento, bem como em parasitos tratados com 1 μM de metronidazol, nas mesmas condições (Fig. 5). Quando nós fizemos as associações do DETC com o metronidazol, em diferentes concentrações de ambas e em um mesmo período de incubação, verificamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e algumas combinações, especialmente quando a concentração do metronidazol está acima de 0,5 μM , o que não ocorre quando comparamos estas combinações com o DETC ou metronidazol isoladamente (Fig. 5). Estes resultados sugerem que não há um efeito sinérgico entre estes compostos em trofozoítos de *Giardia lamblia* nas concentrações utilizadas, já que os valores de IC_{50} de ambas as drogas se encontram próximos aos valores empregados experimentalmente neste estudo.

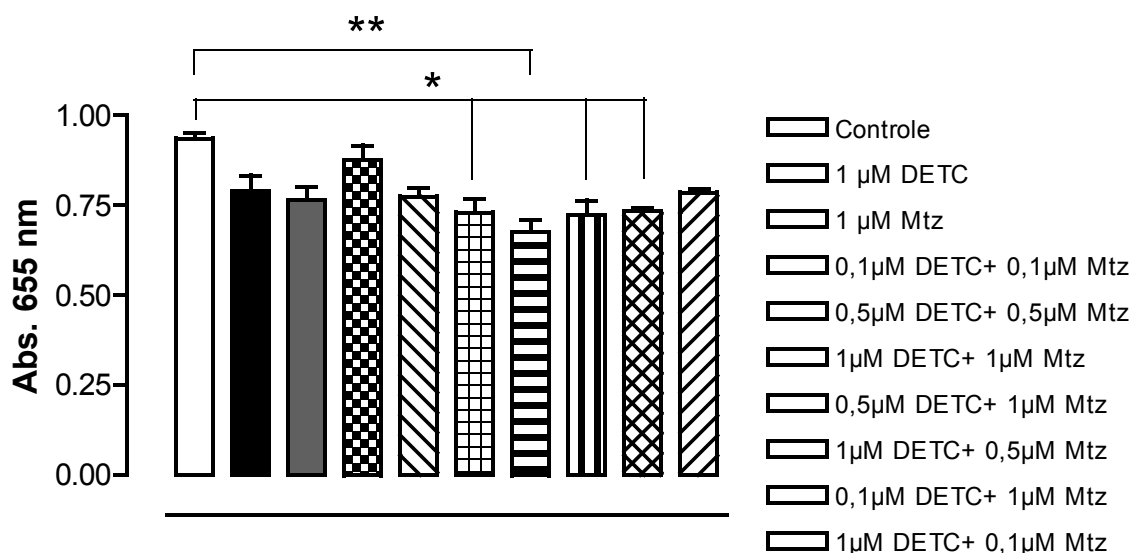


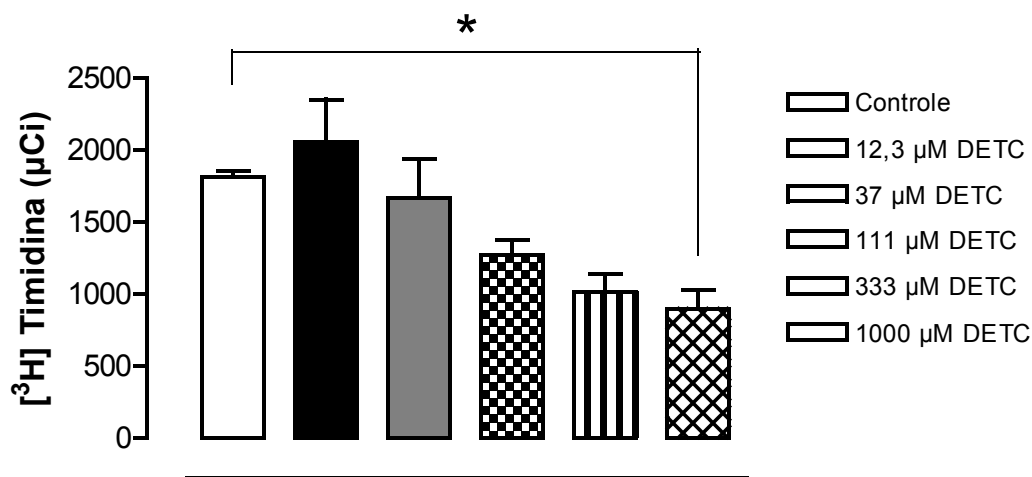
Figura 5. Avaliação de possível sinergismo entre DETC e metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*. As células foram incubadas com ambas as drogas em diferentes combinações ou isoladamente, por 24 horas. Houve uma inibição estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; **, $p <$

0,01) da proliferação celular em parasitos tratados com concentrações mais elevadas de ambas as drogas, porém os resultados não indicam efeito sinérgico desta associação.

5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos do DETC em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com DETC, verificamos uma diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Fig. 6A). O valor de IC₅₀ para este composto em esplenócitos foi cerca de 217 µM, muito acima dos valores encontrados para seu efeito giardicida. O metronidazol não causou citotoxicidade em esplenócitos (Fig. 6B) nas mesmas concentrações utilizadas para o DETC, sugerindo que estas células são menos suscetíveis à ação do 5-nitroimidazol em comparação ao tiocomposto. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o DETC causa seu efeito citotóxico em células do baço difere significativamente do utilizado para ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

(A)



(B)

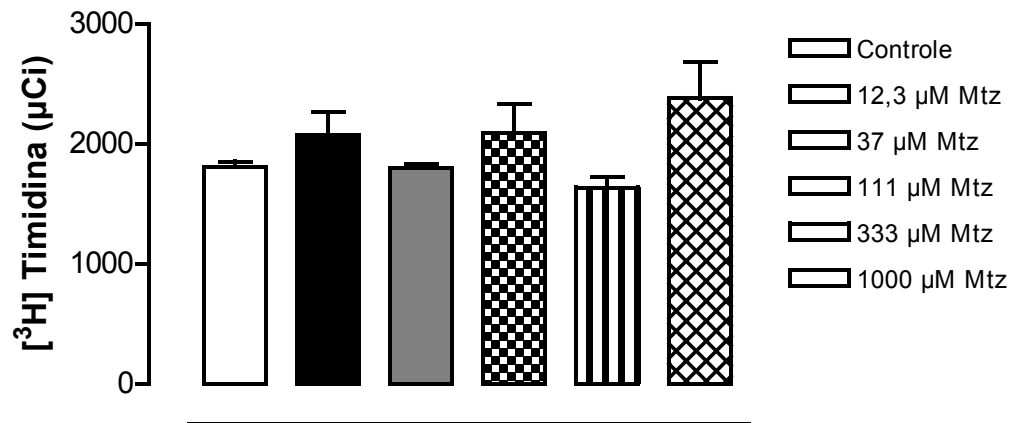


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos. Células do baço de camundongos Balb/C foram tratadas com DETC (A) ou metronidazol (B), por 24 horas. Houve uma redução da taxa de proliferação dos esplenócitos tratados com DETC, indicada pela redução da incorporação de timidina com o aumento da concentração da droga. (* $p < 0,05$). O metronidazol não reduziu a incorporação de timidina destas células, nas mesmas concentrações.

5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para verificar os possíveis efeitos causados pelo DETC neste parasito, testamos se a atividade giardicida desta substância está associada com o conteúdo dos tióis livres através da detecção pela sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA), que se liga seletivamente a grupos tiol em presença de grupamentos amino. Em parasitos controle foi observada uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de algumas células (Fig. 7A). Em parasitos tratados com DETC a 200 μ M por 24 horas, algumas células apresentavam uma marcação com intensidade menor ou ausente em comparação ao controle, indicando que o DETC está bloqueando os tióis da célula (Fig. 7C). Este resultado indica a participação dos tióis livres no efeito giardicida do composto.

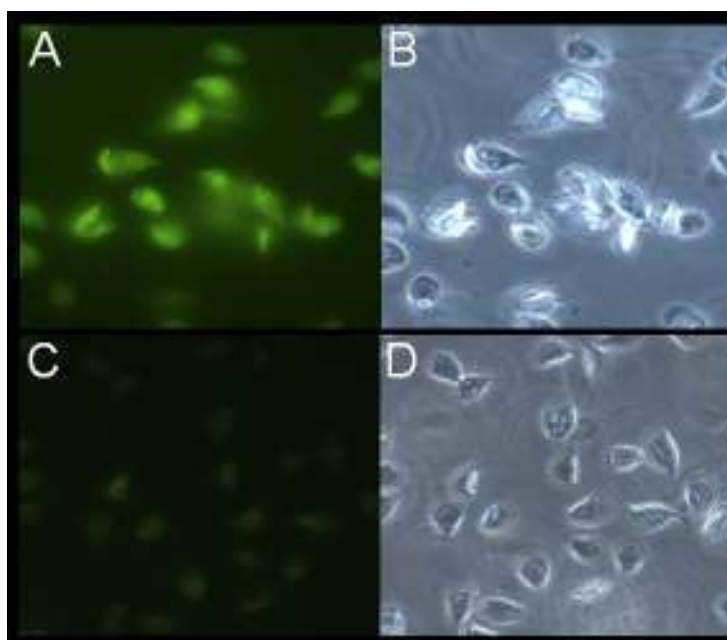


Figura 7. Análise do conteúdo de tióis livres em trofozoítos de *G. lamblia*. Detecção de grupos sulfidríla através da sonda fluorescente *orto*-phthaldialdeído (OPA – A e C). Células controle apresentam uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de alguns trofozoítos (A). Trofozoítos de *Giardia lamblia* tratados com 200 μ M de DETC por 24 horas, apresentando uma fraca marcação (C) em relação ao controle. Visualização das células por microscopia de contraste de fase (B e D).

5.5. Determinação de tíóis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com o objetivo de detectar as concentrações totais de grupos tiol presentes neste parasito, foi utilizado o reagente de Ellman (1959), que determina quantitativamente grupos sulfidril em amostras biológicas. Após 2 horas de incubação com 100 μM de DETC, foi possível observar um decréscimo do conteúdo de grupamentos tiol totais em comparação ao controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Fig. 8). O metronidazol nas mesmas concentrações não levou à diminuição destes grupos sulfidril, com níveis de detecção comparáveis aos do controle. Quando as células foram incubadas com a associação de ambos, observamos uma diminuição da expressão de grupamentos tiol, porém houve um discreto aumento em comparação ao DETC. Estes resultados sugerem que o DETC diminui a capacidade antioxidante de *G. lamblia* através do decréscimo da expressão de grupos tiol presentes neste parasito, não havendo efeitos aditivos ou sinérgicos entre os compostos.

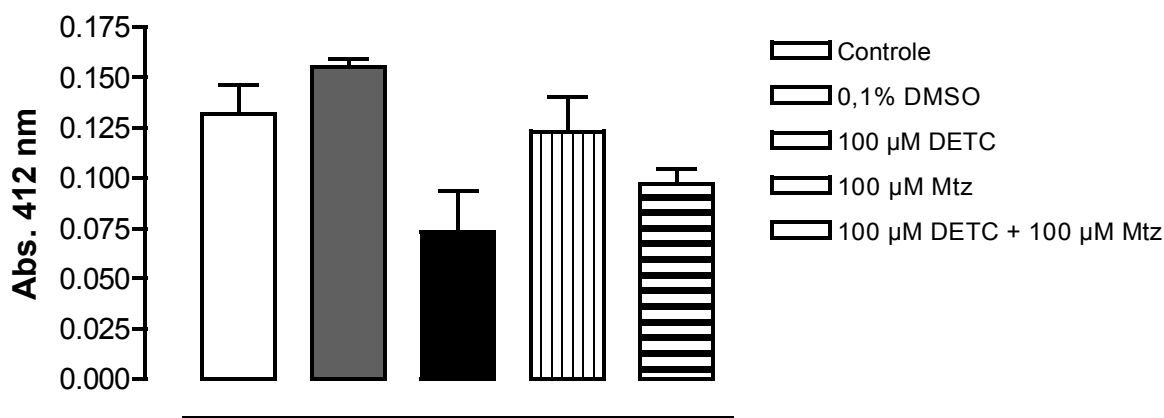


Figura 8. Quantificação dos grupos sulfidril em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Houve uma diminuição dos níveis de tíóis totais em células tratadas com 100 μM de DETC por 2 horas em relação ao controle, porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Parasitos tratados com metronidazol apresentaram valores semelhantes ao controle e a combinação do DETC com o metronidazol levou a um discreto aumento dos níveis de tíóis livres em comparação ao DETC.

5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação dos tióis livres, nós avaliamos a participação destes grupamentos na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*. Em células tratadas com 25 μM de DETC por 24 horas, observamos um decréscimo na proliferação celular em relação às células controle (Fig. 9). A adição de 25 μM de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultura não afetou a proliferação do parasito *in vitro*. A incubação das células com DETC e NAC, ambos a 25 μM , levou à reversão parcial do efeito giardicida do DETC, aumentando discretamente à medida que elevamos a concentração do NAC (Fig. 9). Estes dados indicam que o efeito do DETC nestas células está associado, ao menos parcialmente, com os grupamentos tiol presentes neste parasito, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, já que a NAC não foi capaz de reverter totalmente os efeitos causados pelo DETC.

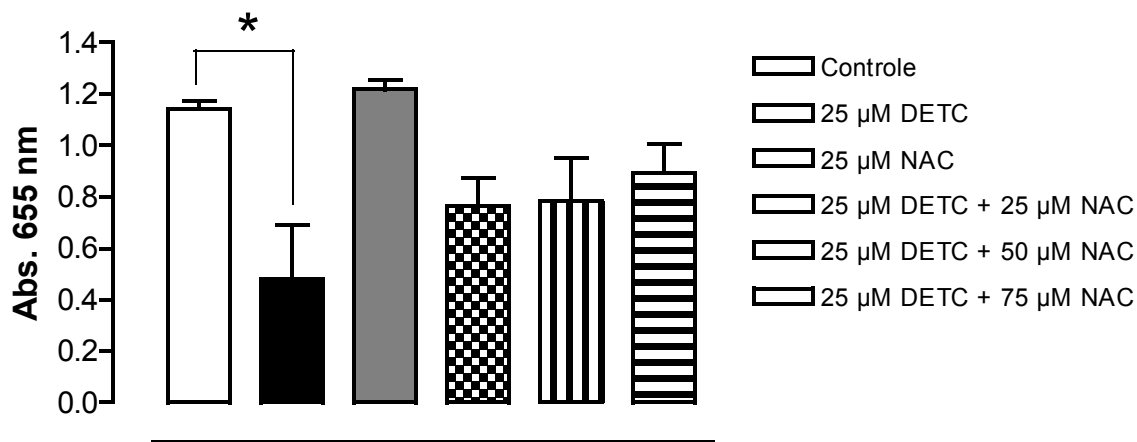
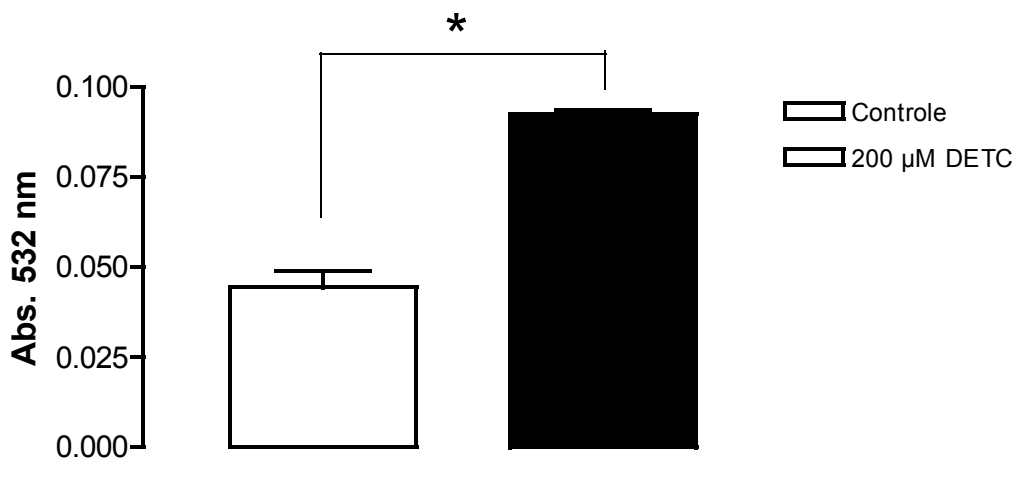


Figura 9. Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de *Giardia* em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC). Células tratadas com 25 μM de DETC apresentaram uma redução na proliferação em comparação ao controle (*, $p < 0,05$). Quando associamos o NAC ao DETC em diferentes proporções há uma reversão parcial do efeito inibitório do DETC.

5.7. Quantificação de lipoperoxídeos em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com a observação de que o DETC é capaz de diminuir os níveis de tióis livres neste parasito e por conseqüência a sua capacidade antioxidante, decidimos verificar os danos oxidativos celulares através da quantificação bioquímica da peroxidação lipídica através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas, houve um aumento significativo desta lipoperoxidação (Fig. 10A). A associação do DETC com a NAC foi capaz de reverter a lipoperoxidação causada pelo DETC (Fig. 10B). Estes dados sugerem que o DETC está elevando o estresse oxidativo, sendo este efeito modulado por cisteína, possivelmente pela interação destas duas moléculas com conseqüente inibição da atividade do DETC.

(A)



(B)

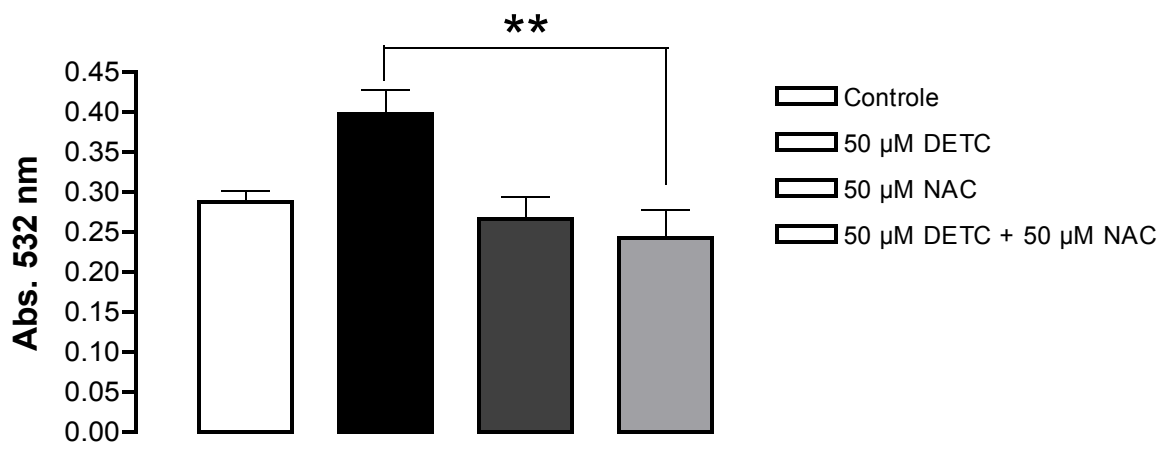


Figura 10. Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células tratadas com 200 μM de DETC por 4 horas apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle (*t* de Student, * $p < 0,001$). **(B)** Houve uma reversão dos efeitos do DETC quando foi realizado o co-tratamento com a NAC, em parasitos tratados por 2 horas (** $p < 0,05$).

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Como um dos efeitos do DETC é o aumento dos danos oxidativos celulares em trofozoítos de *Giardia*, resolvemos em seguida avaliar a produção espécies reativas através da sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes), que é permeável à membrana celular, se tornando impermeável no espaço intracelular quando se liga a espécies reativas de oxigênio, emitindo fluorescência. A maioria das células controle estavam viáveis, com grande motilidade ou aderidas à lâmina de vidro, não apresentando marcação para a sonda (Fig. 11A - B). Os trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora se encontravam menos móveis e com alterações morfológicas na superfície celular. Nestas células observou-se uma marcação homogênea (Fig. 11C), um pouco mais pronunciada em regiões de protuberância membranosa, conhecidas como “blebs” (Fig. 11D). Assim como no controle, as células tratadas com 200 µM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação para a sonda. Isto provavelmente se deve ao fato de que a grande maioria destas células já estavam mortas, não sendo possível a detecção da sonda intracelularmente (Fig. 11E - F).

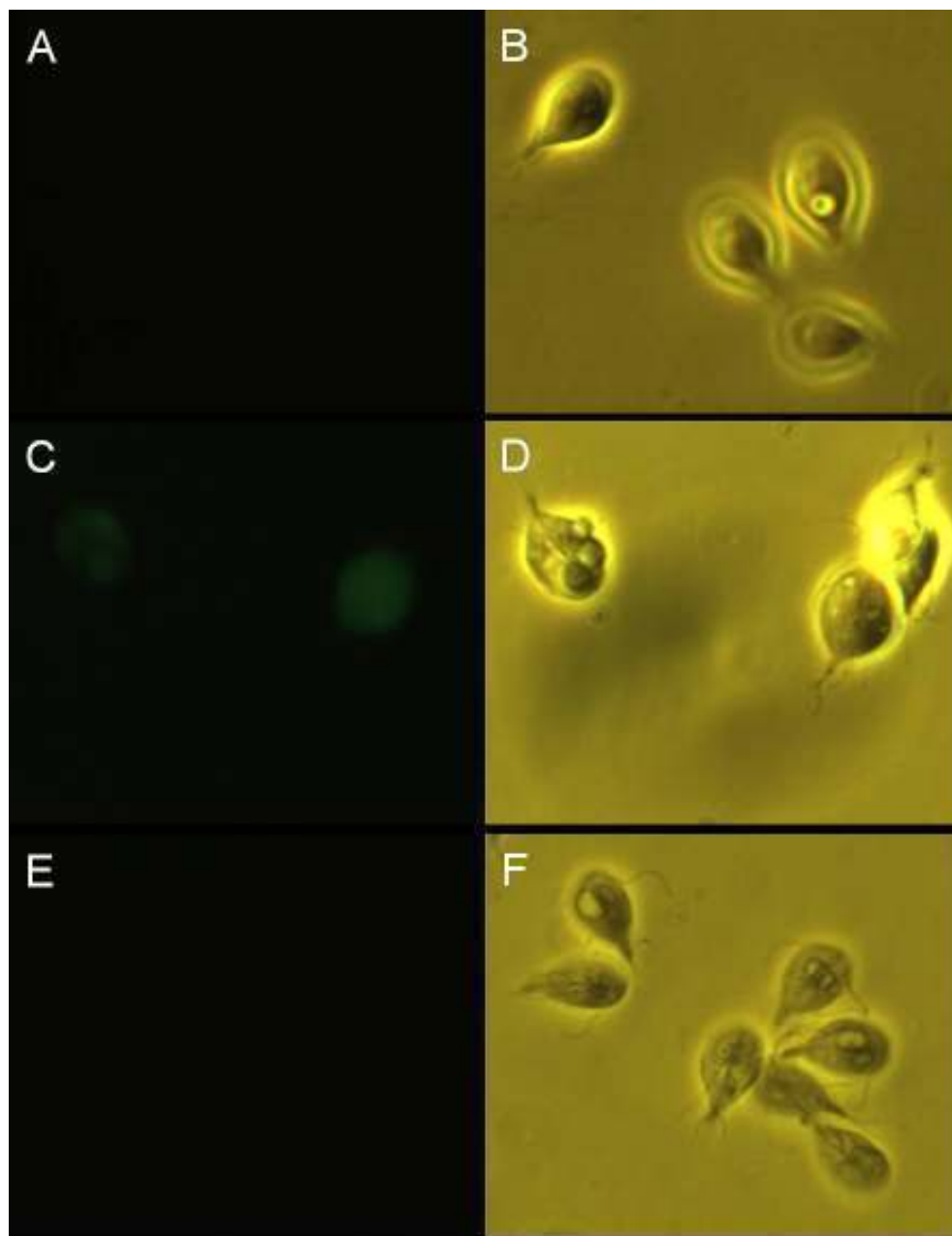


Figura 11. Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia*. A sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para detecção de espécies reativas neste parasito. Células controle não apresentaram marcação. (A e B) O tratamento com 100 μM de DETC por 1 hora levou ao aparecimento de células com alterações morfológicas (D) e marcadas com a sonda fluorescente (C). Trofozoítos tratados com 200 μM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação com H₂DCFDA (E), possivelmente porque estas já estavam mortos (F).

5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC

Para entender melhor os efeitos do DETC em trofozoítos de *G. lamblia*, nós incubamos as células em presença ou ausência de 200 μM desta substância por 24 horas e depois de processadas, foram visualizadas em MET. As células controle apresentavam-se íntegras com uma grande quantidade de partículas de glicogênio e cisternas de retículo endoplasmático distribuída pelo citoplasma (Fig. 12A). Vesículas periféricas foram observadas subjacentes à membrana plasmática (Fig. 12B). Nestas células também podemos verificar em corte transversal estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos, o funis (Fig. 12C) e o disco adesivo (Fig. 12D). Os núcleos, presentes na região anterior dos parasitos, encontravam-se homogêneos, bem delimitados pela membrana nuclear (Fig. 12D). Em parasitos tratados com DETC, mais de 50% das células apresentavam-se com alto grau de extração citoplasmática, inclusive do conteúdo nuclear (Fig. 13A). Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito (Fig. 13B), sugerido pela presença de estruturas virguliformes ou com dupla membrana circunscrevendo porções citoplasmáticas. Possível participação do retículo endoplasmático é sugerida, já que este se encontrava dilatado e próximo às vesículas (Fig. 13C), que também se apresentaram maiores e menos numerosas do que no controle, sugerindo a ocorrência de confluência das mesmas (Fig. 13D).

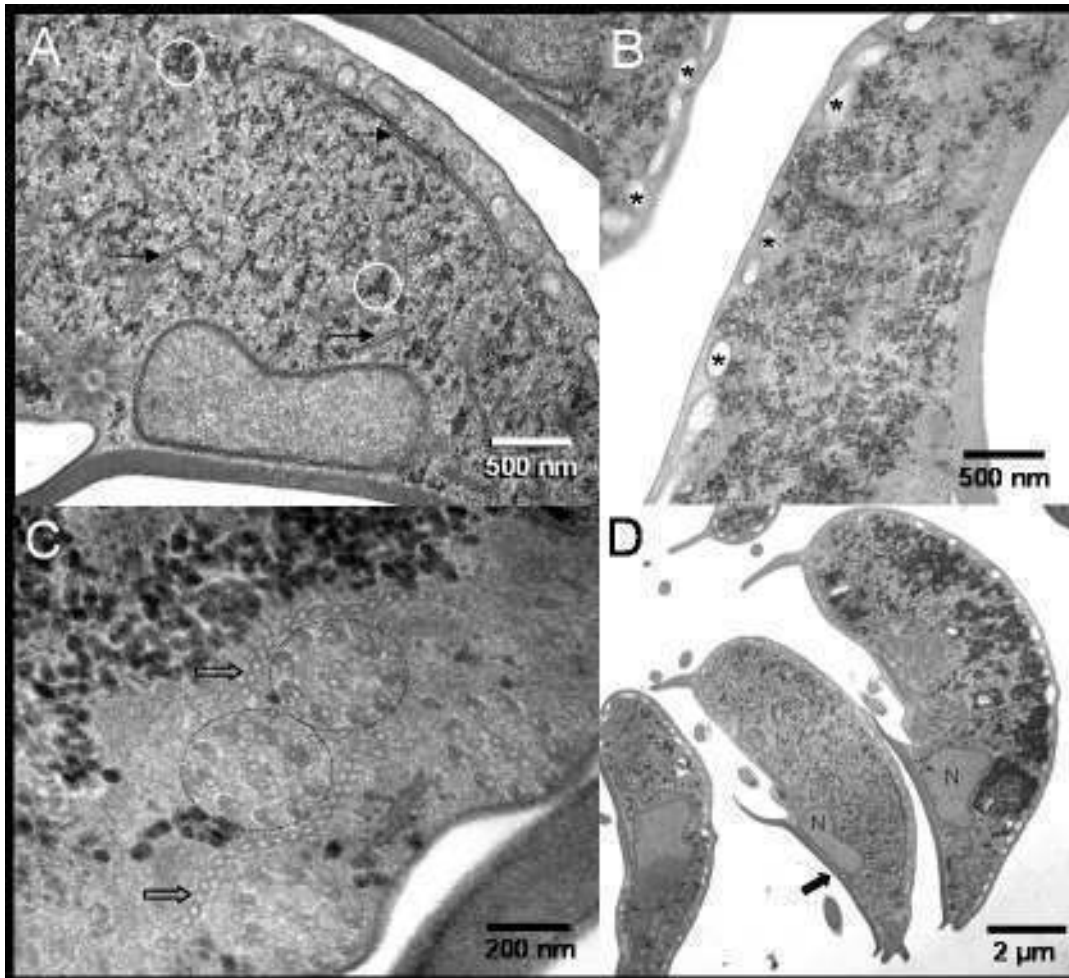


Figura 12. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células controle apresentando citoplasma homogêneo, com grânulos de glicogênio (assinalado por círculos brancos) e retículo endoplasmático (setas). Em (B), visualizamos as vesículas periféricas (*) na região dorsal da célula. (C) Estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (assinalados por círculos pontilhados) e o corpo funis (setas). Em (D), observamos células em corte longitudinal apresentando núcleos (N) e o disco adesivo (seta).

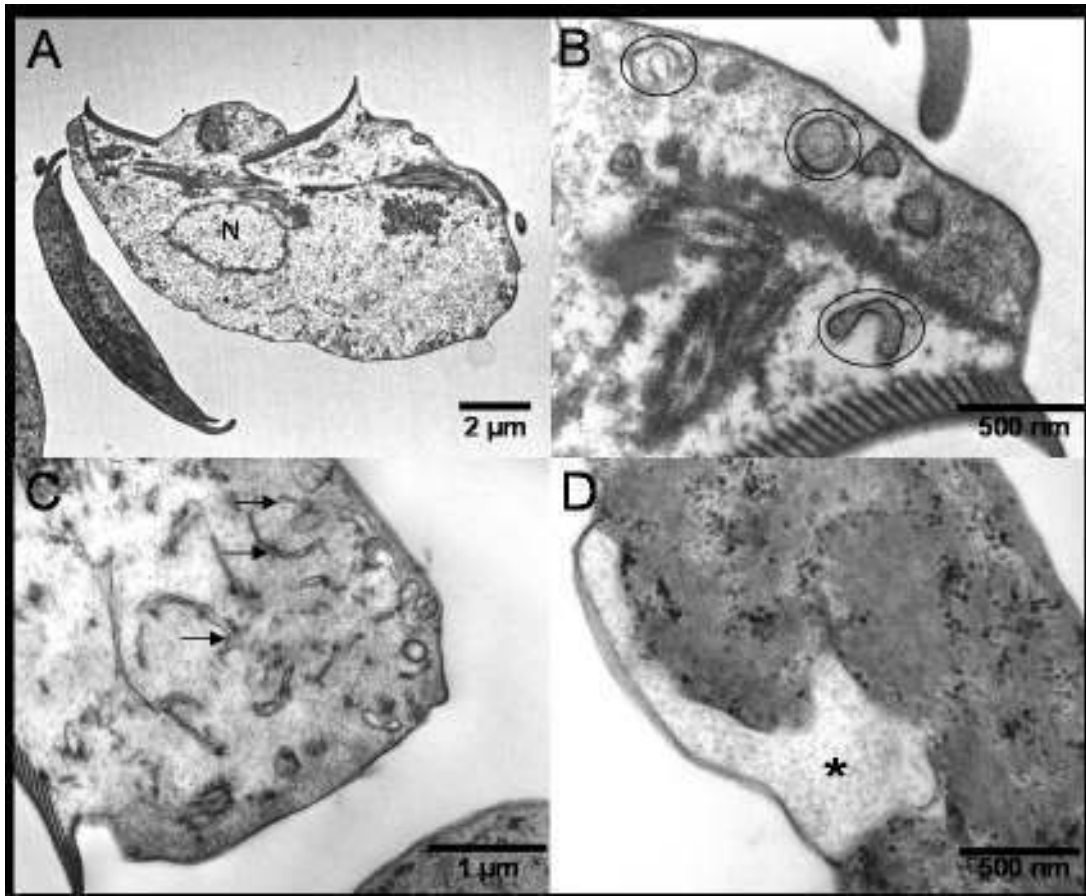


Figura 13. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *G. lamblia* tratados com DETC. (A) Células tratadas com 200 µM de DETC por 24 horas apresentando reduzida eletrondensidade de citoplasma e nucleoplasma, em comparação às células controle (Fig. 12). (B) Visualização de vesículas virguliformes ou com dupla membrana (assinaladas por círculos), sugerindo possíveis processos autofágicos. Em (C), observamos este mesmo processo, com provável participação do retículo endoplasmático, que se encontra mais dilatado quando comparado ao controle. Em (D), visualizamos uma célula apresentando grande compartimento alongado, presumivelmente formado pela fusão homofílica das vesículas periféricas.

6. DISCUSSÃO

A elucidação dos efeitos do DETC, um conhecido inibidor de SOD, é de importância fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em sua atividade giardicida, já que a ausência de SOD em *Giardia* nos permite evidenciar a existência de efeitos independentes desta enzima, produzidos pela ação do DETC em protozoários parasitas.

Apesar de ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, a inibição da proliferação celular pelo DETC aparentemente não é dose-dependente. Uma das possíveis explicações para este fato é que esta substância pode ser oxidada de forma muito rápida, principalmente em soluções, perdendo parte da sua atividade. Outra possibilidade é que o composto atue sobre um limitado “pool” de resíduos de cisteína, assim o efeito atingiria um plateau ao reagir com os grupos SH disponíveis. A manipulação deste composto precisa ser feita com presteza, evitando sua exposição ao ar e/ou aumento da temperatura. Embora seja uma droga relativamente instável, seu efeito giardicida é bastante satisfatório, com níveis comparáveis ao do metronidazol *in vitro*.

O dissulfiram, medicamento utilizado no tratamento contra o alcoolismo, age como um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Brien & Loomis, 1985). Este fármaco sofre rápida redução enzimática no sangue pela glutatona redutase (Strömme, 1963; Cobby *et al.*, 1977), mas pode também ser reduzido de forma não enzimática pela albumina (Agarwal *et al.*, 1983). Subseqüentemente, DETC é metabolizado por tiol metiltransferase ou tiopurina metiltransferase a DETC-Me (Gessner & Jakubowski, 1972; Glauser *et al.*, 1993; Lill *et al.*, 1996), que sofre oxidação principalmente pelo citocromo P-450, com uma contribuição minoritária de flavina monooxigenases (Johansson *et al.*, 1989). Os metabólitos oxidados do dissulfiram têm sido descritos como potentes inibidores da ALDH, através da carbamilação de um grupo tiol crítico no sítio ativo da enzima (Jin *et al.*, 1994; Tonkin *et al.*, 2003).

Por ser reduzido rapidamente *in vivo* a DETC, o dissulfiram se torna uma poderosa ferramenta quimioterápica no tratamento contra a giardíase. Este fármaco já foi testado *in vitro* e *in vivo* contra *Giardia lamblia* (Nash & Rice, 1998), com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para o DETC com trofozoítos *in vitro*.

Quando analisamos a associação do DETC com o metronidazol, verificamos que não houve um efeito sinérgico entre estas duas drogas. Em *Entamoeba histolytica*, o metronidazol é

capaz de se ligar covalentemente a algumas proteínas específicas, incluindo superóxido dismutase e tioredoxina redutase, esta última sendo uma das responsáveis pela ativação do metronidazol neste protozoário através da redução do grupo nitro (Leitsch *et al.*, 2007). Além disso, os níveis de cisteína são reduzidos com a adição do metronidazol, provavelmente pela reação desta droga com os grupos sulfidríla acessíveis neste parasito (Leitsch *et al.*, 2007). Como a tioredoxina redutase é uma enzima muito comum, é provável que processos similares ocorram em outros organismos procarióticos e/ou eucarióticos. Nesse sentido, o efeito giardicida do DETC e metronidazol pode estar associado à competição de ambas as drogas pelos mesmos mecanismos de ativação em *Giardia lamblia*, que apresenta uma enzima semelhante à tioredoxina redutase, a dissulfeto redutase (Brown *et al.*, 1996b) e proteínas ricas em cisteína (Luján & Nash, 1994). Em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, o mecanismo deste 5-nitroimidazol está relacionado à sua redução pela piruvato:ferredoxina oxidorreductase a radicais citotóxicos que levam a danos irreversíveis e morte celular (Müller, 1986). Apesar disso, resistência ao metronidazol em *E. histolytica* pode ser atribuída à diminuição de enzimas antioxidantes, como peroxiredoxina (Wassmann *et al.*, 1999) e superóxido dismutase (Samarawickrema *et al.*, 1997), assim como em *G. lamblia*, onde o aumento da atividade da enzima NADH oxidase tem sido associado a cepas resistentes ao metronidazol (Ellis *et al.*, 1993).

Alguns trabalhos têm desencorajado a utilização do dissulfiram e metronidazol em associação, principalmente pelo acúmulo de acetaldeído causado pela inibição da enzima ALDH por estes fármacos (Gardner & Hill, 2001) em pacientes que fazem ingestão de álcool, levando ao efeito “antabuse” (sensação de calor, náusea, vômitos e taquicardia) (Finegold, 1980; Edwards *et al.*, 1986; Krulewitch, 2003). A utilização destas duas drogas em conjunto poderia potencializar este efeito, além de causar em alguns pacientes reações psicóticas, conforme alertado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu bulário eletrônico.

Quando analisamos a incorporação de timidina por células do baço na presença de diferentes concentrações de DETC ou metronidazol, observamos que não houve uma diferença significativa nos níveis de incorporação entre as células controle e tratadas com o metronidazol. No entanto, o DETC apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas concentrações acima de 111 μM . Apesar disso, o valor de IC_{50} encontrado para trofozoítos de *Giardia* (*i.e.* 2 μM) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A farmacocinética e os efeitos colaterais do dissulfiram têm sido extensivamente estudados, gerando dados para a elaboração de formulações e regimes terapêuticos apropriados. Sua biodisponibilidade é maior que 80% após administração oral e a eliminação do dissulfiram e seus metabólitos é um processo lento. Aproximadamente 20% da droga permanece no corpo após 1 a 2 semanas (Ellenhorn *et al.*, 1997 *apud* Sauna *et al.*, 2005). Apesar de ser recomendado o monitoramento de pacientes que usam altas doses do dissulfiram (acima de 250 mg por dia) (Fuller & Gordis, 2004), existem poucos efeitos colaterais associados com longos períodos de tratamento. Hepatotoxicidade é a causa mais comum de preocupações durante a utilização do dissulfiram (Sauna *et al.*, 2005), contudo este efeito adverso é geralmente reversível quando seu uso é interrompido na presença de manifestações clínicas (Wright *et al.*, 1988). A excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais graves tornam o dissulfiram uma droga segura e eficaz, inclusive com aprovação pela FDA e ANVISA.

A redução nos níveis de grupamentos tiol em trofozoítos tratados com DETC foi observada tanto por microscopia de fluorescência, quanto pela avaliação quantitativa através do reagente de Ellman (DTNB). Estes resultados sugerem que o DETC esteja carbamilando e/ou formando pontes dissulfeto com grupamentos tiol livres que estão presentes em *Giardia* e que são responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito, a exemplo das proteínas ricas em cisteína e dissulfeto redutase. De modo interessante, a atividade do dissulfiram em trofozoítos de *G. lamblia* foi reduzida pela adição de cisteína ao meio (Nash & Rice, 1998), sugerindo que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga. O metronidazol também reduziu os níveis de tióis totais em *Giardia*, porém não houve diferenças entre o tratamento com as drogas feito isoladamente ou em conjunto.

Cepas de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol estão associadas a um aumento da atividade da enzima NADH oxidase, possibilitando a detoxificação de espécies oxidativas (Ellis *et al.*, 1993). É provável que cepas sensíveis ao metronidazol sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, já que estas apresentam diminuição do consumo de O₂ (Ellis *et al.*, 1993), com possível redução dos níveis de grupos sulfidril livres, que podem ser oxidados através da ativação do grupo nitro deste fármaco.

Para confirmar o papel dos grupamentos tiol no efeito giardicida do DETC, nós incubamos os trofozoítos de *Giardia* em concentrações crescentes de NAC, associadas ou não a este composto. Não houve diferenças significativas entre células tratadas com 25 µM de NAC e o

grupo controle, porém houve uma diminuição significativa da proliferação celular quando adicionamos 25 μ M de DETC ao meio de cultura. A pré-incubação do NAC com o DETC na proporção 1:1 reverteu parcialmente a inibição, aumentando discretamente à medida que esta proporção de NAC foi aumentada. A presença de resíduos de cisteína tem sido enfatizada na literatura como um fator de crescimento essencial para *Giardia lamblia* (Luján & Nash, 1994), conferindo proteção contra os efeitos letais do oxigênio (Fairlamb, 1989). As análises de incorporação de L-cisteína por este parasito indicam a presença de ao menos dois sistemas de transporte. L-cistina não foi incorporada pelos trofozoítos, sugerindo a ausência de um sistema de transporte e a especificidade dos transportadores de cisteína. *Giardia* não é capaz de sintetizar cisteína ou metionina a partir de sulfato, nem de converter metionina em cisteína, sendo assim o protozoário é auxotrófico para este aminoácido (Luján & Nash, 1994).

As CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície (VSPs), são os principais antígenos de *Giardia lamblia*. Cerca de 150 diferentes genes que codificam estas proteínas tem sido identificados no genoma deste parasito. Somente uma VSP é expressa por trofozoíto, permitindo que *Giardia* mude a expressão desta proteína em sua superfície (Nash, 2002). O mecanismo desta variação antigênica ainda não está claro, mas este não envolve rearranjo de DNA e é refletido por mudanças na expressão gênica em nível de RNA mensageiro (Nash, 2002). Diferenciação pode induzir variação antigênica *in vitro* (Svärd *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002;) e *in vivo* (von Allmen *et al.*, 2004). Análises de anticorpos IgA anti-*Giardia* em leite materno de mães que vivem em área endêmica de giardiase, provavelmente com múltiplas infecções com diferentes cepas de *Giardia*, revelou que as VSPs são as proteínas imunorreativas dominantes (Téllez *et al.*, 2005).

Estes dados nos indicam que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga, apesar de não ser o único. Em 1930, o dissulfiram começou a ser utilizado como escabicida e vermífico por ser um quelante de cobre, um componente essencial da cadeia respiratória de artrópodes e helmintos (Eneanya *et al.*, 1981). A atividade quelante de metal também é relatada para o DETC, que é um específico inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (Pritsos *et al.*, 1989; Majid & Nishiyama, 2002). As proteínas com motivos dedo de zinco são essenciais para o funcionamento celular normal (Berg & Shi, 1996), tornando-se um importante alvo terapêutico (Rein *et al.*, 1997). *Giardia* expressa altos níveis de CRP na superfície, as quais

possuem motivos de zinco (Luján *et al.*, 1995c). O zinco pode ser quelado pelo DETC, se apresentando como uma outra via de atuação desta droga neste parasito.

Os danos oxidativos celulares em membranas de trofozoítos tratados com DETC foram avaliados através da formação de um produto citotóxico, o malondialdeído (MDA), que se liga ao TBA gerando uma reação colorimétrica indicativa da peroxidação lipídica (Bellé *et al.*, 2004). Houve um aumento significativo da lipoperoxidação em parasitos tratados com 200 μ M DETC, por 4 horas. O metronidazol levou a um aumento discreto da peroxidação lipídica e a associação entre o DETC e o metronidazol não elevou significativamente a peroxidação, com níveis comparáveis ao DETC utilizado isoladamente, provavelmente porque a concentração do DETC já estava alta, levando ao plateau da peroxidação celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, no entanto as membranas são um dos componentes mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997). Este processo pode levar à morte celular através de alterações na estrutura e permeabilidade de membrana, levando à perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas (Hershko, 1989). O NAC foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do DETC, demonstrando a importância dos grupamentos tiol no mecanismo de ação desta droga.

Baseado na confirmação de que o DETC promove lipoperoxidação, provavelmente pelo aumento da geração de radicais livres de oxigênio, resolvemos avaliar a produção de espécies reativas por esta droga em *Giardia lamblia* com a sonda fluorescente H₂DCFDA. As células controle não apresentaram marcação para a sonda, enquanto que trofozoítos tratados com 100 μ M de DETC por 1 hora foram marcados de forma homogênea, demonstrando que este tiocomposto está aumentando a formação de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Isto se deve ao fato de que a redução de grupos sulfidril livres pode estar afetando o potencial redutor deste parasito, levando ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo não pôde ser visualizado em células tratadas com 200 μ M de DETC, possivelmente porque estas já se encontravam mortas.

Os metabólitos mais comuns produzidos pela utilização do oxigênio em organismos aeróbicos são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que participa da reação que produz o radical hidroxila (OH^{\cdot}), sendo este último extremamente reativo (Cadenas, 1989). Superóxido é usualmente detoxificado pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água por catalase, peroxidase e a enzima dependente de glutatona, glutatona

peroxidase (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). Além destas enzimas de detoxificação convencionais, mecanismos alternativos podem ser utilizados para diminuição do estresse oxidativo celular, que incluem as dioxigenases e monooxigenases (citocromo P-450 redutase) (Malmström, 1982). Algumas oxidases dependentes de flavina (NADH oxidase) reduzem tetravalentemente o oxigênio a água, abolindo a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em bactérias anaeróbicas (Schmidt *et al.*, 1986), assim como a NADH peroxidase, uma flavoenzima envolvida na redução do peróxido que também desempenha papel antioxidante em algumas células (Stanton & Jensen, 1993).

Alguns protozoários microaerófilos também possuem NADH oxidase. *Entamoeba histolytica* contém uma NADPH oxidase dependente de flavina que produz peróxido quando purificada (Lo & Reeves, 1980). *Trichomonas vaginalis* contém uma flavo-oxidase que produz água, além de uma NADPH oxidase produtora de peróxido (Linstead & Bradley, 1988). *Giardia* também apresenta atividades oxidase e peroxidase dependentes de NADH (Brown *et al.*, 1996a; Brown *et al.*, 1998), responsáveis pela capacidade deste parasito de detoxificar o oxigênio. As principais enzimas de detoxificação de espécies oxidantes, como a SOD, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase não estão presentes neste protozoário, salientando a importância da manutenção de um ambiente intracelular redutor através da ciclagem redox pelos grupos sulfidril presentes em *Giardia*.

A elucidação dos efeitos microbicidas do DETC foi possibilitada pela microscopia eletrônica de transmissão, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 200 μM de DETC por 24 horas, houve um alto grau de extração citoplasmática, apresentada por mais de 50% das células. Este efeito é causado provavelmente pelo colapso do potencial de membrana, com conseqüente rompimento da membrana plasmática pelo aumento do estresse oxidativo (Lloyd *et al.*, 2000), onde a indução de radicais livres de oxigênio leva a uma inativação de sistemas que consomem oxigênio, acúmulo de peróxido de hidrogênio e oxidação de grupos tiol.

Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito, sugeridos pela presença de estruturas virguliformes ou com membrana dupla, que são semelhantes à formação dos vacúolos em organismos eucariotos (Suzuki & Ohsumi, 2007; Xie & Klionsky, 2007).

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento de sua homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Os mecanismos

envolvem a formação de uma estrutura de dupla membrana dentro da célula, chamada de vacúolo autofágico ou autofagossomo, a partir do retículo endoplasmático e vias secretórias iniciais. A fusão com o lisossomo gera o autofagolisossomo, onde as enzimas hidrolíticas agem na degradação do conteúdo interno (Shintani & Klionsky, 2004). Resposta a condições de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismos de autofagia. É possível que *Giardia* também utilize destes mecanismos para evitar a perda da homeostasia com o aumento do estresse oxidativo, como ocorre em outros tipos celulares (Hill *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

A observação de vesículas que se encontravam maiores e menos numerosas em comparação ao controle nos leva a crer que ocorreu a fusão homofílica destes compartimentos. Este processo pode ter sido mediado por pontes dissulfeto que se formam pela ação do DETC entre as cisteínas das proteínas celulares, conferindo uma modificação da conformação tridimensional à molécula, expondo sítios de reconhecimento e/ou catalíticos e ocasionando uma série de alterações na morfologia e funcionamento normais da célula.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem do estresse oxidativo e conteúdo de grupos tiol podem prover valiosas estratégias terapêuticas para a giardíase.

7. CONCLUSÕES

7.1. O DETC mostrou-se efetivo na inibição da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, porém este efeito aparentemente não é dose-dependente;

7.2. A associação do DETC com o metronidazol não levou a um efeito sinérgico *in vitro*;

7.3. O DETC promove a redução dos níveis de grupos sulfidril livres, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto e/ou carbamilações em moléculas ricas em cisteína que estejam com estes grupamentos tiol acessíveis, como as CRPs, uma das responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito;

7.4. O aumento do estresse oxidativo em trofozoítos de *G. lamblia* pode ser devido à diminuição da capacidade antioxidante deste protozoário, inviabilizando a sua sobrevivência;

7.5. Os resultados apresentados neste trabalho apontam para uma nova abordagem na terapia contra a giardíase. Estudos para avaliação dos efeitos do DETC *in vivo* se colocam como perspectivas em nosso trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ADAGU, I.S., NOLDER, D., WARHURST, D.C., ROSSIGNOL, J.F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, 49:103-11, 2002.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, 14: 447-75, 2001.

AGARWAL, R.P., MCPHERSON, R.A., PHILLIPS, M. Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 42: 293-310, 1983.

AL-MEKHLAFI, M.S., AZLIN, M., NOR AINI, U., SHAIK, A., SA'IAH, A., FATMAH, M.S., ISMAIL, M.G., AHMAD FIRDAUS, M.S., AISAH, M.Y., ROZLIDA, A.R., NORHAYATI, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 686-91, 2005.

APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, 21: 370-6, 2005.

BASSILY, S., FARID, Z., EL-MASRY, N.A., MIKHAIL, E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J Trop Med Hyg**, 90: 9-12, 1987.

BELLÉ, N.A., DALMOLIN, G.D., FONINI, G., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 22: 245-51, 2004.

BENCHIMOL, M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett**, 1:81-7, 2004.

BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, 511: 133-44, 2002.

BERG, J.M., SHI, Y.. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, 23: 1081-5, 1996.

BERNANDER, R., PALM, J.E., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol**, 3: 55-62, 2001.

BIAGINI, G.A., PARK, J.H., LLOYD, D., EDWARDS, M.R. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. **Microbiology**, 147: 3359-65, 2001.

BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharm. J**, 234: 271-4, 1991.

BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J.P. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**, 42: 817-20, 1998.

BRAR, S.S., GRIGG, C., WILSON, K.S., HOLDER, W.D., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A.J., WHORTON, A.R., STOWELL, G.W., WHITTALL, L.B., WHITTLE, R.R., WHITE, D.P., KENNEDY, T.P.. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol Cancer Ther.** 3: 1049-60, 2004.

BREWER, C. How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. **Br J Psychiatry**, 144: 200-2, 1984.

BRIEN, J.F., TAM, G.S., CAMERON, R.J., STEENAART, N.A., LOOMIS, C.W. A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrahydrothiazole, calcium carbimide, and disulfiram. **Can J Physiol Pharmacol**, 63: 438-43, 1985.

BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., EDWARDS, M.R., UPCROFT, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Eur J Biochem**, 1:155-61, 1996a.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 20: 211-20, 1996b.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 72: 47-56, 1995.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 61: 155-8, 1993.

BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, 125: 11-9, 2002.

BUSATTI, H.G., GOMES, M.A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, 101: 819-21, 2007.

CACOPARDO, B., PATAMIA, I., BONACCORSO, V., DI PAOLA, O., BONFORTE, S., BRANCATI, G. Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole-resistant giardiasis **Clin Ter**, 146: 761-7, 1995.

CADENAS, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. **J Biolumin Chemilumin**, 4: 208-18, 1989.

CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Bras. Soc. Med. Trop**, 28: 25-31, 1995.

CARRANZA, P.G., FELTES, G., ROPOLO, A., QUINTANA, S.M., TOUZ, M.C., LUJÁN, H.D. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. **Infect Immun**, 70: 5265-8, 2002.

CHICK, J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. **Drug Saf**, 20: 427-35, 1999.

CHIEN, C.T., SHYUE, S.K., LAI, M.K. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. **Transplantation**, 15: 1183-90, 2007.

CIMERMAN, B., CURY, F.M., MORENO, C.T. Avaliação terapêutica do secnidazol dose única no tratamento da giardíase em crianças. **Pediatr. Mod**, 6: 1008-1012, 1994.

COBBY, J., MAYERSOHN, M., SELLIAH, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, 202: 724-31, 1977.

CRUZ, C.C., FERRARI, L., SOGAYAR, R. A therapeutic trial in *Giardia muris* infection in the mouse with metronidazole, tinidazole, secnidazole and furazolidone **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 223-8, 1997.

DA COSTA-MACEDO, L.M., MACHADO-SILVA, J.R., RODRIGUES-SILVA, R., OLIVEIRA, L.M., VIANNA, M.S. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum communities of the city of Rio de Janeiro, Brazil **Cad Saude Publica**, 14: 851-5, 1998.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIN, J., LECLAIRE, C. Treatment of giardiasis (lambliasis) with metronidazole. Apropos of 100 cases. **Presse Med**, 6: 15-6, 1962.

DEHARO, E., BARKAN, D., KRUGLIAK, M., GOLENSER, J., GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. **Biochem Pharmacol**, 1: 809-17, 2003.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, 45: 2471-6, 1986.

- DUREL, P., ROIRON, V., SIBOULET, A., BOREL, L.J. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. **Br J Vener Dis**, 36: 21-6, 1960.
- ECKMANN, L., LAURENT, F., LANGFORD, T.D., HETSKO, M.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F., GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol**, 1: 1478-87, 2000.
- EDWARDS, D.L., FINK, P.C., VAN DYKE, P.O. Disulfiram-like reaction associated with intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole and metronidazole. **Clin Pharm**, 5: 999-1000, 1986.
- ELLIS, J.E., WINGFIELD, J.M., COLE, D., BOREHAM, P.F., LLOYD, D. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 23: 35-9, 1993.
- EMMERLICH, V., SCHOLZE, H., GILLIN, F.D., BAKKER-GRUNWALD, T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 87: 112-5, 2001.
- EMMERLICH, V., SANTARIUS, U., BAKKER-GRUNWALD, T., SCHOLZE, H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 131-4, 1999.
- ENEANYA, D.I., BIANCHINE, J.R., DURAN, D.O., ANDRESEN, B.D. The actions of metabolic fate of disulfiram. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 21: 575-96, 1981.
- ERTAN, P., YERELI, K., KURT, O., BALCIOĞLU, I.C., ONAĞ, A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. **Pediatr Int**, 44: 286-8, 2002.
- ESCOBEDO, A.A., CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother**, 8: 1885-902, 2007.
- FAIRLAMB, A.H. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. **Parasitology**, Suppl: 93-112, 1989.
- FARTHING MJ. Giardiasis. **Gastroenterol Clin North Am**, 25: 493-515, 1996.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev**, 13: 35-54, 2000.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J Parasitol**, 77: 441-8, 1991.
- FEELY, D.E., DYER, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. **J Protozool**, 34: 80-3, 1987.

FEITOSA, G., BANDEIRA, A.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R., BRITES, C. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, 5: 339-44, 2001.

FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev Assoc Med Bras**, 43: 61-8, 1997.

FINEGOLD, S.M. Metronidazole. **Ann Intern Med**, 93: 585-7, 1980.

FERNANDES, P.D., ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz J Med Biol Res**, 30: 93-9, 1997.

FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54: 679-708, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**, 15: 7761-4, 1989.

FULLER, R.K., GORDIS, E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? **Addiction**, 99: 21-4, 2004.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, 14: 114-28, 2001.

GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J., WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther**, 266: 23-32, 1993.

GASCÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, 73: 102-8, 2006.

GESSNER, T., JAKUBOWSKI, M. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester. A metabolite of disulfiram. **Biochem Pharmacol**, 15: 219-30, 1972.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., MCCAFFERY, J.M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679-705, 1996.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. **Infect Immun**, 56: 705-7, 1988.

GILLIS, J.C., WISEMAN, L.R. Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, 51: 621-38, 1996.

GIULIVI, C., TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 30: 243-51, 1988.

GU, F., CRUMP, C.M., THOMAS, G. Trans-Golgi network sorting. **Cell Mol Life Sci**, 58: 1067-84, 2001.

GUERRANT, R.L., KIRCHHOFF, L.V., SHIELDS, D.S., NATIONS, M.K., LESLIE, J., DE SOUSA, M.A., ARAUJO, J.G., CORREIA, L.L., SAUER, K.T., MCCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J Infect Dis**, 148: 986-97, 1983.

GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.T.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop**, 37: 501-06, 1995.

GUZIK, T.J., OLSZANECKI, R., SADOWSKI, J., KAPELAK, B., RUDZIŃSKI, P., JOPEK, A., KAWCZYNSKA, A., RYSZAWA, N., LOSTER, J., JAWIEN, J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., CHANNON, K.M., KORBUT, R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. **J Physiol Pharmacol**, 56: 313-23, 2005.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*-current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res**, 88: 591, 2002.

HARRIS, J.C., PLUMMER, S., LLOYD, D. Antigiardial drugs. **Appl Microbiol Biotechnol**, 57: 614-9, 2001.

HALL, A.; NAHAR, Q. Albendazole as a treatment for infectious with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 87: 84-6, 1993.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.

HILL, B.G., HABERZETTL, P., AHMED, Y., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth muscle cell. **Biochem J**, 3, 2007.

HILL, D.R. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infect. Dis. Clin. N. A**, 7: 503-25, 1993.

HILL GASTON, J.S., LILICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 17: 219-39, 2003.

HU, P., JIN, L., BAILLIE, T.A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. **J Pharmacol Exp Ther**, 281: 611-7, 1997.

ISAAC-RENTON, J., MOOREHEAD, W., ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. **Appl. Environ. Microbiol**, 62: 47-54, 1996.

ISAAC-RENTON, J.L., CORDEIRO, C., SARAFIS, K., SHAHRIARI, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. **J Infect Dis**, 167: 431-40, 1993.

JARROLL, E.L., SENER, K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. **Drug Resist Updat**, 6: 239-46, 2003.

JIN, L., DAVIS, M.R., HU, P., BAILLIE, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. **Chem Res Toxicol**, 7: 526-33, 1994.

JOHANSSON, B., PETERSEN, E.N., ARNOLD, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethylthiocarbamic acid methyl ester. **Biochem Pharmacol**, 38: 1053-9, 1989.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404, 1982.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. **J Infect Dis**, 140: 984-8, 1979.

KATIYAR, S.K., GORDON, V.R., MCLAUGHLIN, G.L., EDLIND, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, 38: 2086-90, 1994.

KATTENBACH, W.M., PIMENTA, P.F., DE SOUZA, W., PINTO DA SILVA, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res**, 77: 651-8, 1991.

KAVOUSHI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, 28: 19-23, 1979.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 77: 487-88, 1983.

Krulewitch, C.J. An unexpected adverse drug effect. **J Midwifery Womens Health**, 48: 67-8, 2003.

KUŹMICKI, R., JESKE, J. Observations of the efficacy of ornidazole (Tiberall La Roche) in treatment of giardiasis. **Wiad Parazytol**, 40: 65-8, 1994.

LANFREDI-RANGEL, A., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 85: 951-5, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A., KATTENBACH, W.M., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 245-51, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH, W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol**, 123: 225-35, 1998.

LEITSCH, D., KOLARICH, D., WILSON, I.B., ALTMANN, F., DUCHÊNE, M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol**, 5: 211, 2007.

LEMÉE, V., ZAHARIA, I., NEVEZ, G., RABODONIRINA, M., BRASSEUR, P., BALLEET, J.J., FAVENNEC, L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **J Antimicrob Chemother**, 46: 819-21, 2000.

LEVI, G.C., DE AVILA, C.A., NETO, V.A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 19: 422-4, 1977.

LI, L., WANG, C.C. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Mol Microbiol**, 59: 202-11, 2006.

LILL, R., KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, 25: 352-6, 2000.

LILL, J.S., MAYS, D.C., LIPSKY, J.J. S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. **Xenobiotica**, 26: 1025-33, 1996.

LINDMARK, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. **Exp Parasitol**, 65: 141-7, 1988.

LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 10: 476-82, 1976.

LINSTEAD, D.J., BRADLEY, S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 125-33, 1988.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., MITCHELL, A., HUGHES, M.N., WADLEY, R.B., EDWARDS, M.R. Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **J Appl Microbiol**, 5: 576-83, 2003.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., WADLEY, R., RALPHS, J.R., HANN, A.C., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. **Microbiology**, 148: 1349-54, 2002.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., BIAGINI, G.A., WADLEY, R.B., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, 146 12: 3109-18, 2000.

LO, H., REEVES, R.E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 2: 23-30, 1980.

LOEWENSON, R., MASON, P.R., PATTERSON, B.A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. **Ann Trop Paediatr**, 6: 73-8, 1986.

LOO, T.W., CLARKE, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. **J Natl Cancer Inst**, 7: 898-902, 2000.

LÓPEZ NIGRO, M.M., PALERMO, A.M., MUDRY, M.D., CARBALLO, M.A. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. **Toxicol In Vitro**, 17: 35-40, 2003.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61: 294-304, 1997.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., BYRD, L.G., NASH, T.E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 23: 7628-33, 1996.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem**, 8: 29307-13, 1995a.

LUJÁN, H.D., MAROTTA, A., MOWATT, M.R., SCIAKY, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., NASH, T.E. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**, 3: 4612-8, 1995b.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., WU, J.J., LU, Y., LEES, A., CHANCE, M.R., NASH, T.E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. **J Biol Chem**, 9: 13807-13, 1995c.

LUJÁN, H.D., NASH, T.E. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. **J Eukaryot Microbiol**, 41: 169-75, 1994.

MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 161-4, 1998.

- MACHADO, R.C., MARCARI, E.L., DE FÁTIMA, S., CRISTANTE, V., CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíase em crianças de crèches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Brás. Méd. Trop**, 32: 697-704, 1999.
- MADAN, A., PARKINSON, A., FAIMAN, M.D. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. **Drug Metab Dispos**, 23:1153-62, 1995.
- MAJID, D.S., NISHIYAMA, A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. **Hypertension**, 39: 293-7, 2002.
- MALMSTRÖM, B.G. Enzymology of oxygen. **Annu Rev Biochem**, 51: 21-59, 1982.
- MEHLOTRA, R.K., TEKWANI, B.L. Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Microbes Infect**, 1: 385-94, 1999.
- MORGAN, U.M., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 328-31, 1993.
- MÜLLER, N., VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**, 35: 1339-47, 2005.
- MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem Pharmacol**, 1; 35: 37-41, 1986.
- MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, 93: 165-71, 1983.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I., QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, 35: 133-41, 2002.
- NASH, T.E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 45: 585-90, 2002.
- NASH, T., RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1488-92, 1998.
- NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop Med Int Health**, 6: 624-34, 2001.
- OBERHUBER, G., VOGELSANG, H., STOLTE, M., MUTHENTHALER, S., KUMMER, A.J., RADASZKIEWICZ, T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. **Am J Pathol**, 148: 1351-7, 1996.

OLNESS, K. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. **J Dev Behav Pediatr**, 24: 120-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Foodborne Diseases**, 2002. <disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em out, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The World Health Report**, Geneva, 1996

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R.P., DURLACHER, R., DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 621-5, 2001.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin Infect Dis**, 25: 545-9, 1997.

PAGET, T.A., RAYNOR, M.H., SHIPP, D.W., LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 63-7,

PAGET, T.A., JARROLL, E.L., MANNING, P., LINDMARK, D.G., LLOYD, D. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol**, 135: 145-54, 1989.

PILON-SMITS, E.A., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T., PILON, M. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. **Plant Physiol**, 130: 1309-18, 2002.

PIMENTEL, D., COOPERSTEIN, S., RANDELL, H., FILIBERTO, D., SORRENTINO, S., KAYE, B., NICKLIN, C., YAGI, J., BRIAN, J., O'HERN, J., HABAS A., WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, 35: 653-668, 2007.

PRITSOS, C.A., KEYES, S.R., SARTORELLI, A.C. Effect of the superoxide dismutase inhibitor, diethyldithiocarbamate, on the cytotoxicity of mitomycin antibiotics. **Cancer Biochem Biophys**, 10: 289-98, 1989.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, 90: 19-39, 2003.

RAIPULIS, J., TOMA, M.M., SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **Int J Food Microbiol**, 25: 343-7, 2005.

REIN, A., OTT, D.E., MIRRO, J., ARTHUR, L.O., RICE, W.G., HENDERSON, L.E. Suppression of retroviral replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. **Leukemia**, 11: 106-8, 1997.

REINER, D.S., MCCAFFERY, M., GILLIN, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol**, 53: 142-53, 1990.

RIVAS, L., MURZA, A., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Interaction of anti-malarial drug quinacrine with nucleic acids of variable sequence studied by spectroscopic methods. **J Biomol Struct Dyn**, 18: 371-83, 2000.

ROE, F.J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surgery**, 93: 158-64, 1983.

SAMARAWICKREMA, N.A., BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., THAMMAPALERD, N., UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother**, 40: 833-40, 1997.

SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 43: 1533-41, 1999.

SAUNA, Z.E., SHUKLA, S., AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol Biosyst**, 1: 127-34, 2005.

SAUNA, Z.E., NANDIGAMA, K., AMBUDKAR, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. **J Biol Chem**, 19: 48855-64, 2004.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, 22: 203-8, 2006.

SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, 4: 1749-60, 2007.

SCHMIDT, H.L., STÖCKLEIN, W., DANZER, J., KIRCH, P., LIMBACH, B. Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. **Eur J Biochem**, 1: 149-55, 1986.

SCULLY, B.E. Metronidazole. **Méd. Clin. North Am**, 72: 613-21, 1988.

SHINTANI, T., KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, 5: 990-5, 2004.

SLAVIN, I., SAURA, A., CARRANZA, P.G., TOUZ, M.C., NORES, M.J., LUJÁN, H.D. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 122: 95-8, 2002.

SMITH, N.C., BRYANT, C., BOREHAM, P.F. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 18: 991-7, 1988.

STANTON, T.B., JENSEN, N.S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **J Bacteriol**, 175: 2980-7, 1993.

STOCKIS, A., DE BRUYN, S., GENGLER, C., ROSILLON, D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 40: 221-7, 2002.

STROMME, J.H. Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. **Biochem Pharmacol**, 12: 705-15, 1963.

SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., DELGADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MÜLLER, M., TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13: 10368-73, 2004.

SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 22: 2156-61, 2007.

SVÄRD, S.G., MENG, T.C., HETSKO, M.L., MCCAFFERY, J.M., GILLIN, F.D. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 30: 979-89, 1998.

TACHEZY, J., SÁNCHEZ, L.B., MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol Biol Evol**, 18: 1919-28, 2001.

TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.

TÉLLEZ, A., PALM, D., WEILAND, M., ALEMÁN, J., WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E., SVÄRD, S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. **Parasite Immunol**, 27: 163-9, 2005.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**, 9: 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, 32: 493-6, 2002.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infections disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol**, 30: 1259-1267, 2000.

THOMPSON, S.C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J Paediatr Child Health**, 30: 202-9, 1994.

THOMPSON, R.C.A, REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, 32: 71-160, 1993.

TONKIN, E.G., VALENTINE, H.L., ZIMMERMAN, L.J., VALENTINE, W.M. Parenteral N,N-diethylthiocarbamate produces segmental demyelination in the rat that is not dependent on cysteine carbamylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1: 139-50, 2003.

TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, 56: 173-94, 1994.

UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, 14: 150-64, 2001a.

UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Ant. Ag. Chemoth**, 45: 1810-14, 2001b.

UPCROFT, P., EDWARDS, R.M., UPCROFT, J.A., BROWN, D.M. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

UPCROFT, J., UPCROFT, P. My favorite cell: *Giardia*. **Bioessays**, 20: 256-63, 1998.

UPCROFT, J.A., CAMPBELL, R.W., UPCROFT, P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. **Parasitology**, 112: 309-13, 1996.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol Today**, 9: 187-90, 1993.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., BOREHAM, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 20: 489-96, 1990.

VON ALLMEN, N., BIENZ, M., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Experimental infections of neonatal mice with cysts of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. **Infect Immun**, 72: 4763-71, 2004.

WASSMANN, C., HELLBERG, A., TANNICH, E., BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **J Biol Chem**, 10: 26051-6, 1999.

WEBSTER, B.H. Furazolidone in the treatment of giardiasis. **Am J Dig Dis**, 5: 618-22, 1960.

WEINBACH, E.C., CLAGGETT, C.E., KEISTER, D.B., DIAMOND, L.S., KON, H. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. **J Parasitol**, 66: 347-50, 1980.

WOLFE, M.S. Giardiasis. **N Engl J Med**, 9: 319-21, 1978.

VOOGD, C.E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, 86: 243-77, 1981.

WOO, P., PANAYI, G.S. Reactive arthritis due to infestation with *Giardia lamblia*. **J Rheumatol**, 11: 719, 1984.

WOOD, Z.A., SCHRODER, E. ROBIN HARRIS, J., POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, 28: 32-40, 2003.

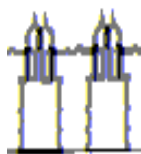
WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, 2: 529-41, 2003.

WRIGHT, C. 4TH., VAFIER, J.A., LAKE, C.R. Disulfiram-induced fulminating hepatitis: guidelines for liver-panel monitoring. **J Clin Psychiatry**, 49: 430-4, 1988.

XIE, Z., KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9: 1102-9, 2007.

YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 281: 30299-304, 2006.

ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop Med Int Health**, 2: 63-82, 1997.



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção
do grau de Mestre.

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A599e Anjos, Karla Graziela Santana dos
Efeitos do dietilditiocarbamato em trofozoítos de *giardia lamblia*: uma nova
ferramenta na terapia contra a giardíase [manuscrito] / Karla Graziela Santana dos. -
2008.
59 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório de Biomorfologia
Parasitária.

1. *Giardia Lamblia*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dietilditiocarbamato. T. I. Título.

CDU 616.995.132:615.32

AGRADECIMENTOS

Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Adriana Lanfredi Rangel

Primeiramente, pela amizade. Sua orientação na bancada foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho. Meu carinho por você é do tamanho do seu coração.

Msc. Cláudio Pereira Figueira

Pela amizade, incentivo e por muitas vezes me ajudar na hora do “sufoco”.

Glória Maria Maranhão Sweet

Por me acolher como uma mãe durante a realização deste trabalho. Sei que seremos eternas amigas!

Msc. Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Brandão

Pela amizade, companheirismo e apoio dado nos momentos difíceis.

Msc. Rafael Gomes, Diego Menezes e Alene Vanessa

Pelas discussões sobre estresse oxidativo e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Elizabeth Mota Costa

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

Elisângela Sodré

Pela amizade e excelente convivência.

Síntia Sacramento, Gustavo Miranda, Antônio Fávero e Edgard Neto

Aos giardólogos e amebólogos, pelo companheirismo e apoio durante todo este tempo na bancada.

Ana Lúcia Costa, Angélica Lacerda, Danielle Anjos, Daniel de Abreu Silva, Rafael Costa,

Thiara Monteiro, Samanta Alexandrino, Fernanda Bomfim e Lourdes Neta

Pela ótima convivência no laboratório.

Msc. Mateus Santos de Sá

Pelo apoio com o experimento de citotoxicidade em linfócitos.

Dr. Jorge Clarêncio

Pelo apoio dado na citometria de fluxo.

Taise Coutinho Caíres

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo suporte dado nas pesquisas.

Todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

Todos os professores e colegas do Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa de 2006

Pelos ensinamentos e amizade.

Todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Minha família (Carlos, Luiza e Vinícius) e meu noivo (Ricardo)

Por vocês existirem! Amo vocês, por inteiro!

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

Aquilo que todos os dias seria limite para nós é destinado a se tornar grande como o olhar de Nossa Senhora. Maria entendia que o conteúdo de cada condição humana desenvolve e realiza o desígnio de um Outro: não o desígnio do próprio coração, mas o do coração de Deus.

As dores, assim como a vida, certamente não lhes faltarão, mas vocês viverão a vida como um caminho; mesmo quando o caminho for fatigante, será a descoberta de um bem realmente grande.

Luigi Giussani

RESUMO

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, onde é exposto a diferentes concentrações de oxigênio. Apesar do metabolismo fermentativo, trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio e mecanismos de detoxificação são requeridos. Desprovido de glutatona, *Giardia* expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína (CRP, também conhecidas como proteínas variantes de superfície ou VSP), como defesa antioxidante. Este mecanismo envolve ciclagem redox para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido e proteção contra o estresse oxidativo. Neste contexto, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem compreender uma poderosa estratégia quimioterápica contra a giardíase. Neste estudo, nós analisamos os efeitos do dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor de superóxido dismutase (SOD), na proliferação do parasito, expressão de tióis totais, lipoperoxidação, produção de radicais livres e arquitetura celular. DETC inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao metronidazol e induziu a peroxidação de membranas neste parasito, possivelmente pelo aumento de espécies reativas. Alterações ultraestruturais também foram observadas neste protozoário. Células tratadas com DETC apresentaram alto grau de extração citoplasmática, além de estruturas indicativas de autofagia. As vesículas periféricas também se encontravam maiores, sugerindo confluência. Estes efeitos são independentes de SOD, já que *Giardia* não apresenta esta enzima. Detecção de grupos tiol com a sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA) foram significativamente moduladas negativamente pelo DETC. Estes dados nos indicam que DETC aumenta o estresse oxidativo em trofozoítos de *Giardia lamblia* pela reação com grupos tiol.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, dietilditiocarbamato, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The microaerophilic protozoan *Giardia lamblia* inhabits the upper small intestine mucosa of vertebrate hosts, where it is exposed to different concentrations of oxygen. Despite the fermentative metabolism, *Giardia* trophozoites consume O₂ and produce oxygen free radicals and therefore mechanism for detoxification are required. Devoid of glutathione, *Giardia* express high concentrations of cystein-rich proteins (CRP, also known as variable surface protein or VSP), as an antioxidant defense. This mechanism involves redox cycling for maintenance of a reduced intracellular environment and protection from oxidative stress. In this regard, substances that interfere in the antioxidant response of this protozoan could comprise a powerful chemotherapeutic strategy for *Giardia lamblia* infection. Here, we analyzed the effects of DETC, a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, on parasite proliferation, thiol expression, lipid peroxidation, free radicals detection and cell architecture. DETC inhibited parasite proliferation at levels similar to metronidazole and induced peroxidation of membrane, possibly by the increase of reactive species. Ultrastructural alteration were also observed. Since this protozoan is devoid of SOD, here present data indicate SOD-independ DETC effects. Thiol groups detection with the fluorescent probe *o*-phthaldialdehyde (OPA). Cells treated with DETC displayed washed out cytoplasm and structures indicative of autophagy. The peripheral vesicles also had an increased volume, presumably caused by homophilic fusion. Taken together these data indicate that DETC enhance the oxidative stress in *Giardia* trophozoites by reacting with thiol groups.

Keywords: Giardia lamblia, diethyldithiocarbamate, oxidative stress.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	05
Figura 2	Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	06
Figura 3	Trofozoíto de <i>Giardia</i> em seção transversal.....	09
Figura 4	Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.....	24
Figura 5	Avaliação do possível sinérgico do DETC e metronidazol em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	25
Figura 6	Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.....	27
Figura 7	Análise da expressão de tióis livres em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8	Quantificação dos grupos sulfidríla em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Figura 9	Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia</i> em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 10	Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	32
Figura 11	Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 12	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	36
Figura 13	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> tratados com DETC.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Ceará
CO ₂	Dióxido de carbono
CRPs	Proteínas ricas em cisteína
Cu	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT-diaforase	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
DTNB	5,5'- ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico)
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ DCFDA	5'- (6')- carboxi, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulina A
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Me	Grupamento metil
Mtz	Metronidazol
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
S	Enxofre

SH	Grupo sulfidrina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido dismutase
SP	São Paulo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VSPs	Proteínas variantes de superfície
<i>Zn</i>	<i>Zinco</i>

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A giardíase.....	01
1.2. A giardíase no Brasil.....	02
1.3. Ciclo biológico.....	03
1.4. O trofozoíto.....	07
1.5. Mecanismos de detoxificação de espécies reativas em <i>Giardia</i>	10
1.6. Tratamento da giardíase.....	11
1.6.1. Nitroimidazóis.....	11
1.6.2. Quinacrina.....	13
1.6.3. Furazolidona.....	14
1.6.4. Benzimidazóis.....	14
1.6.5. Paromicina.....	15
1.6.6. Nitazoxanida.....	15
1.6.7. Bacitracina complexada a sais de zinco.....	16
1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas.....	16
1.7. Dissulfiram: novos potenciais terapêuticos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19

3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	20
4.3. Ensaio de inibição.....	20
4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	20
4.5. Detecção de tióis totais.....	21
4.6. Lipoperoxidação.....	21
4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas.....	21
4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol.....	22
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	22
4.10. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	23
5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	25
5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i>	26
5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	28
5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC.....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GIARDÍASE

A Giardíase é uma enteroparasitose causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Espécies deste gênero infestam mais de 40 espécies de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2002; Appelbee *et al.*, 2005), que podem agir como reservatório para cepas patogênicas em humanos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma cística infectante que pode sobreviver no ambiente por meses e a trofozoíta, que prolifera intensamente na porção anterior do intestino (Adam, 2001). As manifestações clínicas da doença são diarreia aguda ou crônica (eventualmente esteatorréia), desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller & Von Allmen, 2005; Gascón, 2006). Artrite reativa também tem sido associada com infestações entéricas por *Giardia lamblia* (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), bem como o status nutricional afetando função cognitiva e desenvolvimento escolar em crianças pela prevalência de doenças infecciosas intestinais (Olness, 2003).

A distribuição da giardíase é mundial, sendo a parasitose intestinal mais comum em países desenvolvidos, com taxas de detecção entre 2-5% e, 20-30% em nações em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 1996 que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tinham sintomas de giardíase com cerca de 500.000 novos casos por ano, especialmente entre crianças. Em 2004, a giardíase foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido a sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarreicas (OMS, 2002).

Atualmente as infecções por *G. lamblia* são controladas por drogas, sendo as mais efetivas as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 1998). Casos de resistência clínica são relatados na literatura (Townson, 1994; Farthing, 1996), com taxas de recorrência acima de 90% (Zaat *et al.*, 1997). Além disso, o metronidazol exibe potencial carcinogênico para humanos (Bendesky *et al.*,

2002). Desta forma, a identificação de novas vias parasito-específicas e desenvolvimento de novas drogas é necessário para o tratamento da giardíase.

No lúmen intestinal do hospedeiro vertebrado, *Giardia* é exposta a diferentes concentrações de oxigênio (Biagini *et al.*, 2001). Apesar do metabolismo fermentativo, *Giardia* consome O₂, produzindo radicais livres de oxigênio e a resposta imune também pode usar espécies oxidativas (Fernandes & Assreuy, 1997). Desta forma, mecanismos de detoxificação são requeridos (Brown *et al.*, 1995). Trofozoítos de *Giardia* são cobertos por proteínas ricas em cisteína (CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície), envolvidas na proteção do parasito contra os efeitos letais do oxigênio (Mehlotra & Tekwani, 1999). Além disso, estas proteínas estão associadas à resistência a proteases e à variação antigênica, sendo identificados cerca de 150 genes diferentes que codificam para as CRPs em *G. lamblia* (Nash, 2002). A enzima dissulfeto redutase está presente em *Giardia*, conferindo um balanço redox dissulfeto intracelular, ressaltando a importância da cisteína neste parasito na resposta ao estresse oxidativo. A cisteína é descrita como um fator de crescimento essencial para a *Giardia*, o que pode ser verificado no cultivo axênico (Luján & Nash, 1994; Mehlotra & Tekwani, 1999). Nesse sentido, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem constituir uma poderosa estratégia quimioterápica no parasitismo por *Giardia lamblia*.

1.2. A GIARDÍASE NO BRASIL

No Brasil, sua ocorrência é em grande parte desconhecida - principalmente em adultos. Prevalências relatadas de giardíase em crianças brasileiras variam de 14,6% em populações específicas a 78,3% em creches e crianças em idade escolar (Machado & Costa-Cruz, 1998; da Costa-Macedo *et al.*, 1998; Orlandi *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo sobre a giardíase foi realizado em Gonçalves Dias no município de Fortaleza (CE), acompanhando crianças recém-nascidas até os 4 anos de idade (Newman *et al.*, 2001). Dentre as 157 crianças, 43 (27,4%) encontravam-se infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 46% apresentaram recorrências ou recidivas. As crianças que apresentavam sintomas tiveram valores reduzidos de peso e altura, quando avaliados física e nutricionalmente.

No Hospital da Universidade Federal da Bahia, foi realizado um estudo detalhado sobre a prevalência de parasitos intestinais em 365 pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Cerca de 4,9% destes pacientes apresentaram infestação por *Giardia lamblia*, demonstrando uma prevalência significativamente aumentada quando comparada ao grupo que não apresentava a SIDA (2,4%). O grupo controle foi composto por 5243 pacientes (Feitosa *et al.*, 2001).

Machado *et al.* (1999), em um estudo sobre a incidência de giardíase em crianças de creches e escolas de ensino fundamental e médio, no município de Mirassol (SP), confirmam os dados obtidos por outros autores (Wolfe, 1978; Cardoso *et al.*, 1995; Guimarães & Sogayar, 1995) que tanto a idade (2 a 6 anos) quanto o nível sócio-econômico (até 6 salários mínimos) são fatores de risco determinantes da giardíase. Isto se dá pelo fato do nível sócio-econômico e grau de escolaridade mais baixos influenciarem as condições de higiene pessoal e cuidados com alimentos e água (Machado *et al.*, 1999). Um estudo prospectivo de doenças diarréicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para aquisição de giardíase (Guerrant *et al.*, 1983).

Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) demonstraram haver associação entre má nutrição (desnutrição energético-protéica) e o parasitismo por *Giardia lamblia* através da observação de redução significativa dos valores de peso em relação à idade e altura. Outros estudos demonstraram a relação entre infestações por *Giardia* e subnutrição na África (Loewenson *et al.*, 1986) e Ásia (Al-mekhlafi *et al.*, 2005). Ertan *et al.* (2002) também encontraram associação entre baixos níveis séricos de ferro e zinco e a giardíase.

O decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasito (Wolfe, 1978; Hill, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1999) e também com a melhoria dos hábitos de higiene pessoal associada ao aumento da idade.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

A infestação por *Giardia* ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados por fezes contendo cistos (Fig. 1), como ocorre freqüentemente em creches e

orfanatos onde as condições de higiene podem estar comprometidas (Thompson, 2004). O encistamento ocorre no trato digestório, auxiliado pelo baixo pH e proteases estomacais (Adam, 2001), dando origem ao excizoíto (Bernander *et al.*, 2001). O excizoíto é oval, possui oito flagelos, quatro núcleos e metabolismo intermediário entre o trofozoíto e o cisto (Fig. 2). Possui uma ploidia total de 16N, sofrendo divisão celular por duas vezes sem replicação do DNA, gerando quatro trofozoítos com uma ploidia de 4N (Bernander *et al.*, 2001). Estes últimos irão se dividir por fissão binária e a adesão ao epitélio intestinal se dá através do disco ventral (Elmendorf *et al.*, 2003).

O encistamento ocorre com a passagem dos trofozoítos pelo lúmen intestinal, onde eles se soltam e são expostos na região posterior do intestino a um pH mais alcalino (em torno de 7,8), ácidos graxos e sais biliares (Gillin *et al.*, 1988). A ausência de lipoproteínas também demonstrou ser um fator de promoção do encistamento, o que pôde ser revertido pela adição de colesterol (Luján *et al.*, 1996).

O processo de formação da parede cística envolve a ativação dos genes de encistamento em resposta a estímulos e posterior síntese de proteínas que constituirão a parede cística (Lujan *et al.*, 1995a; 1997), as quais são transportadas para a membrana plasmática através das vesículas específicas de encistamento (ESVs) (Reiner *et al.*, 1990; Benchimol, 2004). Durante o tráfego destas proteínas, é provável que haja a participação das vesículas periféricas na maturação do material a ser secretado (Touz *et al.*, 2002a).

O potencial zoonótico desta doença tem sido considerado na literatura como um fator de relevância na transmissão peridomiciliar de felídeos e canídeos (Thompson, 2000).

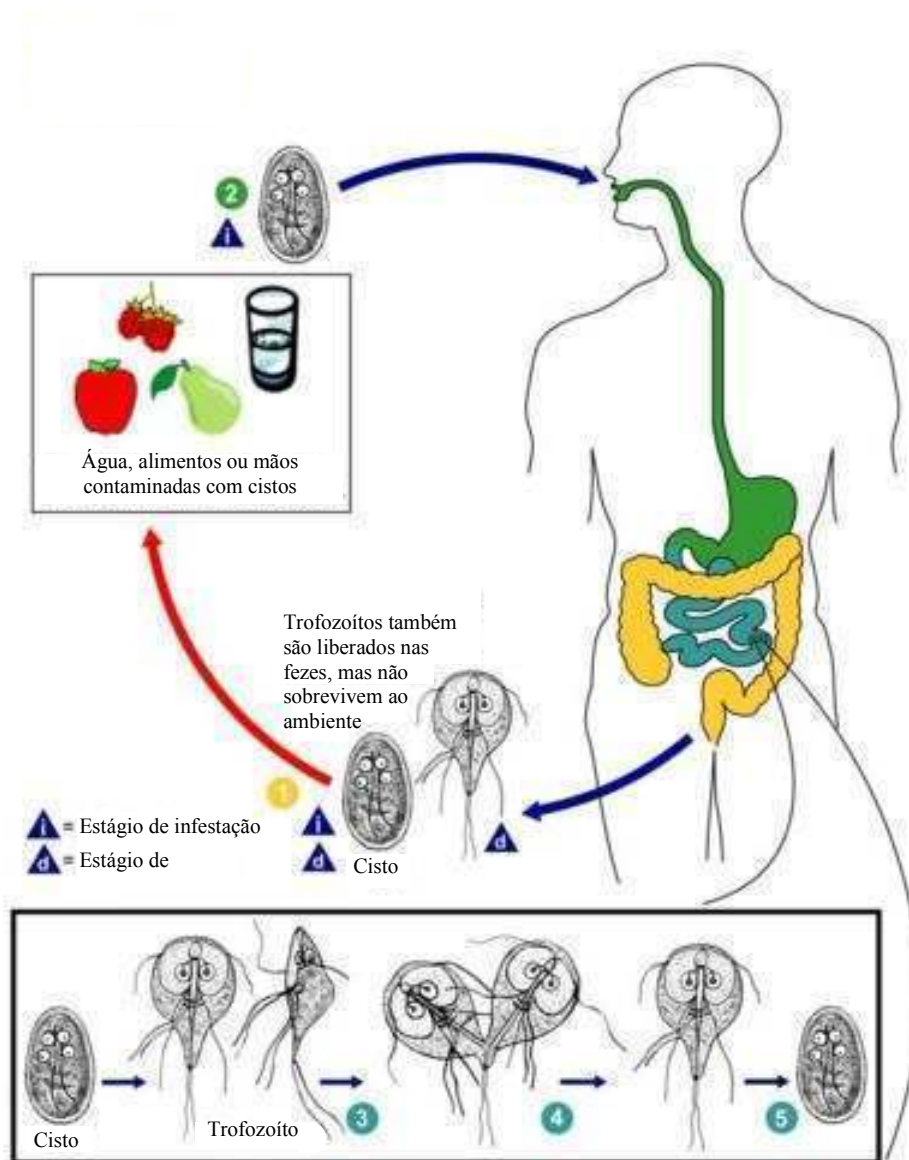


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Cistos e trofozoítos eliminados através das fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Trofozoítos em processo de divisão. (5) Encistamento. Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc-gif>.

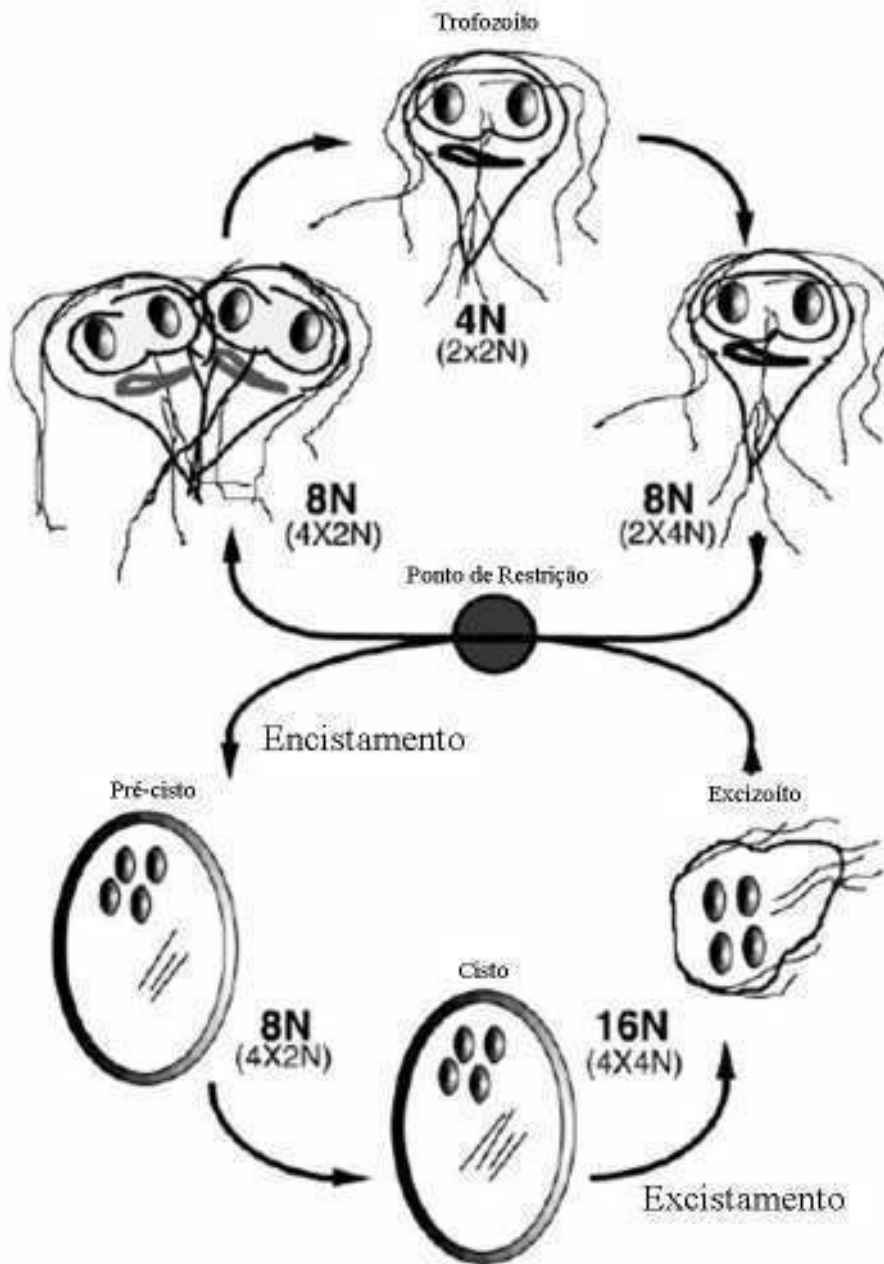


Figura 2. Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Durante o crescimento vegetativo, a ploidia varia entre 4N e 8N. Após a estimulação do encistamento e concomitante formação da parede cística, o núcleo se divide, resultando em uma célula tetranucleada com ploidia de 8N. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros, com uma ploidia celular de 16N. O excistamento resulta na liberação de um excizoíto, que se divide duas vezes para formar quatro trofozoítos, contendo cada um dois núcleos diplóides. Adaptado de Bernander *et al.*, 2001.

1.4. O TROFOZOÍTO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* são piriformes, possuindo cerca de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, látero-posterior, caudal e ventral), sendo que os axonemas caudais são acompanhados pelo corpo funis e um disco adesivo é responsável pela adesão do trofozoíto às microvilosidades intestinais (Fig.3). Possui dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente e simétricos ao eixo longitudinal (Revisto por Adam, 2001). Ribossomos e grânulos de glicogênio se apresentam por todo o citoplasma e o retículo endoplasmático se projeta da região perinuclear até a região das vesículas periféricas, na região dorsal da célula (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). O complexo de Golgi torna-se visível em trofozoítos em processo de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999), mas não tem sido confirmada a presença em trofozoítos vegetativos (Gillin *et al.*, 1996). Apesar disso, mecanismos de transporte de proteínas estão presentes em *Giardia*, semelhantes aos que ocorrem na rede *trans* do aparelho de Golgi na maioria das células complexas (Gu *et al.*, 2001). Algumas evidências sugerem que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar organela(s) com função típica de Golgi, apesar de não ter sua aparência. NBD-ceramida, um marcador do complexo de Golgi em células de mamíferos, marcou uma estrutura perinuclear tanto em trofozoítos vegetativos, quanto em células em processo de encistamento (Luján *et al.*, 1995b; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

As vesículas periféricas são caracterizadas pela acidez dos seus compartimentos, como demonstrado através da incorporação de laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), bem como pela concentração de ferritina exógena e lucifer yellow, sugerindo seu papel na endocitose (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Os vacúolos contêm uma variedade de enzimas com atividade hidrolásica, como por exemplo, a fosfatase ácida, proteases e RNase, indicando suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). É provável que ocorra maturação destes vacúolos de endossoma inicial, tardio até lisossomo, processo que pode estar funcionalmente associado ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Apesar de *Giardia* não possuir mitocôndria, a presença de membranas especializadas com função transportadora de elétrons tem sido detectada (Lloyd *et al.*, 2002). Conhecidas como mitossomos, estas organelas são responsáveis pela produção de H₂ e apresentam maquinaria protéica para biossíntese de centros Fe-S (Tachezy *et al.*, 2001). Em eucariotos, este processo

ocorre exclusivamente em organelas limitadas por dupla membrana, como mitocôndria (Lill & Kispal, 2000), hidrogenossomos (Sutak *et al.*, 2004) e cloroplastos (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Peroxissomos, que são organelas citoplasmáticas responsáveis por reações oxidativas, estão ausentes neste parasito.

Os proteassomos de *Giardia* apresentam muitas similaridades com os de Archaea (Emmerlich *et al.*, 1999). Além disso, proteínas alvo de proteassomos são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar presente neste protozoário como um gene de cópia única, o que o distingue dos outros eucariotos, que possuem múltiplas cópias desse gene (Emmerlich *et al.*, 2001).

Cerca de 30% dos trofozoítos apresentam uma protrusão ventral que emerge da região central do disco adesivo. A observação desta estrutura revelou a presença de cisternas de retículo endoplasmático, muitas vezes formando membranas concêntricas envolvendo quantidades variadas de grânulos de glicogênio, possivelmente em processo de degradação, além de vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

A flange ventrolateral é uma projeção citoplasmática maleável, semelhante a lamelipódios, localizada entre as regiões de superfície ventral e dorsal e que se ajusta as microvilosidades das células epiteliais durante a adesão (revisto por Adam, 2001).

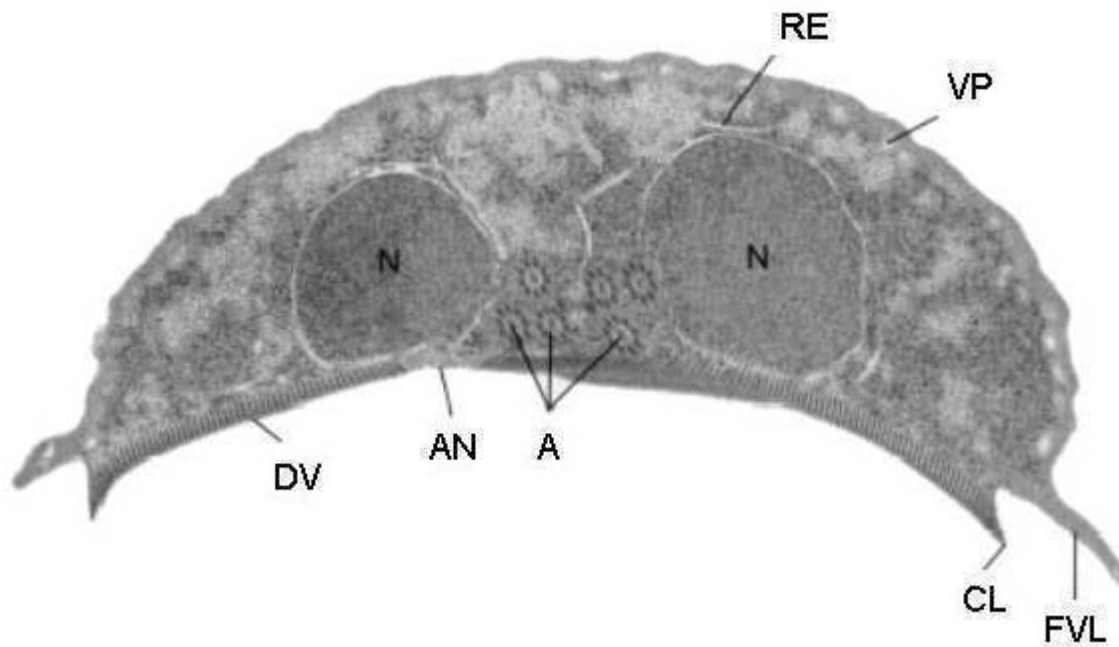


Figura 3. Trofozoíto de *Giardia* em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Adaptado de Adam, 2001.

1.5. MECANISMOS DE DETOXIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM *Giardia*

Apesar de não possuir mitocôndria, *Giardia* consome oxigênio e os produtos finais do seu metabolismo de glicose são sensíveis às tensões de O₂ presentes no lúmen intestinal. Em um ambiente anaeróbico, etanol, alanina e dióxido de carbono (CO₂) são formados em concentrações equimolares. Contudo, quando o oxigênio é introduzido, o balanço de carbono é radicalmente alterado. A produção de alanina é reduzida em cerca de 90% e a produção de acetato é simultaneamente aumentada em cerca de dez vezes. A concentração de CO₂ é aproximadamente duas vezes aumentada, mas a produção de etanol não é alterada (Paget *et al.*, 1990). A capacidade de respirar de alguns protozoários anaeróbicos sugere que eles são capazes de transferir elétrons ao oxigênio como seu acceptor final. Contudo, seu metabolismo permanece fermentativo, mesmo em condições aeróbicas. A utilização de O₂ por *Giardia lamblia* não é afetada por inibidores de respiração mitocondrial, mas bloqueada por flavo-antagonistas, inibidores de tiol e quelantes de metal (Weinbach *et al.*, 1980), sugerindo que algumas das flavoproteínas, tioproteínas e metaloproteínas podem usar O₂ como acceptor de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio neste parasito.

Os mecanismos de detoxificação de espécies oxidativas neste parasito incluem a atividade citoplasmática de uma oxidase flavina-dependente (NADH oxidase), que reduz tetravalentemente O₂ em H₂O, além de estar envolvida em mecanismos de resistência ao metronidazol de algumas cepas, que expressam altos níveis de atividade desta enzima (Ellis *et al.*, 1993). A susceptibilidade de *Giardia lamblia* ao oxigênio também é justificada pela presença da DT-diaforase, uma enzima que tem sua atividade acompanhada pelo aumento intracelular de peróxido de hidrogênio (Li & Wang, 2006). A NADH peroxidase, localizada na região transmembrana de *Giardia lamblia*, catalisa a formação de água a partir de peróxidos (Brown *et al.*, 1995).

Um importante mecanismo de proteção contra o ambiente hostil ao qual *Giardia* é submetido no intestino está relacionado a um ambiente redutor produzido pelas CRPs, que apresentam de 11 a 12% de cisteína e são expressas em *Giardia lamblia* em concentrações milimolares (Luján & Nash, 1994). A cisteína é o principal tiol de baixo peso molecular neste parasito, mas baixos níveis de sulfito, ácido tioglicólico e coenzima A também foram observados, enquanto que glutatona e seus intermediários não foram detectados (Brown *et al.*, 1993). Além disso, subsequente identificação de uma dissulfeto redutase (semelhante à tioredoxina redutase),

que utiliza cistina como aceptor primário de elétrons em *Giardia*, parece ser o maior sistema de atividade redox tiol-dissulfeto contra o estresse oxidativo neste protozoário (Brown *et al.*, 1996b). Pesquisas em dados de base genômicas em *G. lamblia* revelaram também homólogos de tioredoxinas peroxidases que, se expressadas, podem proteger organismos dos radicais livres de oxigênio pela redução de peróxidos com os elétrons da tioredoxina (Wood *et al.*, 2003).

Algumas das enzimas reconhecidamente envolvidas na detoxificação de radicais livres de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água pela catalase, não estão presentes em *Giardia*, sugerindo a importância dos grupamentos tiol na sobrevivência deste parasito (Brown *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Biagini e colaboradores (2001) descreveram o potencial antioxidante do piruvato em *Giardia*, transformando não enzimaticamente superóxido e peróxido de hidrogênio em acetato e CO₂.

Uma importante estratégia do parasito *G. lamblia* contra a defesa do hospedeiro durante a colonização da mucosa intestinal se dá através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase epitelial, por uma competição pela arginina, utilizada como fonte de energia pelo parasito. O NO apresenta propriedades citostáticas contra *Giardia* e o bloqueio de sua produção, conseqüentemente, permitirá a sua proliferação (Eckmann *et al.*, 2000).

Morte de trofozoítos de *Giardia lamblia* por macrófagos murinos ativados ocorreu rapidamente *in vitro* (Fernandes & Asseruy, 1997), com 60% dos parasitos sendo eliminados em cerca de 2 horas. Um inibidor de NO sintase, *N*-iminoetil-1-ornitina, protegeu os organismos. A extrema sensibilidade deste parasito ao estresse nitrosativo é principalmente devida à interrupção de funções da membrana plasmática, e perda da capacidade do consumo de O₂ em associação com a diminuição da atividade flagelar (Lloyd *et al.*, 2003).

1.6. TRATAMENTO DA GIARDÍASE

1.6.1. Nitroimidazóis

Os agentes da classe dos nitroimidazóis utilizados para tratamento de infecções por *Giardia* incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. O metronidazol foi primeiramente relatado para o tratamento da tricomoníase (Durel *et al.*, 1960), sendo posteriormente indicado para uso terapêutico na giardíase (Darbon *et al.*, 1962). Desde então, a síntese e testes biológicos de outros compostos nitroimidazóis têm sido uma crescente, aumentando o arsenal terapêutico contra protozoários e bactérias anaeróbicas (Scully, 1988; Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 2001a; Harder, 2002). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (Raether & Hänel, 2003).

Dos nitroimidazóis, o mecanismo de ação do metronidazol tem sido o mais amplamente estudado. A ativação da droga se dá através da redução do seu grupo nitro pela piruvato: ferredoxina oxidoredutase (Townson *et al.*, 1994; Samuelson, 1999), e um gradiente favorecendo o transporte intracelular do metronidazol é estabelecido por esta reação de redução. A atividade antimicrobiana deste composto reduzido resulta da reatividade e dismutação de intermediários instáveis, que matam os trofozoítos através da interação com várias moléculas essenciais como o RNA, DNA, proteínas e componentes de membrana, resultando em danos celulares irreversíveis (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988; Freeman *et al.*, 1997). Além destes efeitos, o metronidazol inibe o consumo de O₂ do trofozoíto, por agir como um aceptor de elétrons alternativo (Paget *et al.*, 1989). Apesar de este composto ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, ele se mostra ineficaz contra os cistos, provavelmente pela dificuldade em ultrapassar a barreira imposta pela parede cística (Thompson *et al.*, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do metronidazol incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (Levi *et al.*, 1977; Kavousi, 1979). Além disso, a inibição da aldeído desidrogenase por esta droga pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), pela ingestão de álcool durante o período de tratamento (Gardner & Hill, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos em altas doses por longos períodos tem sido relatado na literatura (Lindmark & Muller, 1976; Voogd, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (Bendesky *et al.*, 2002). O uso prolongado deste fármaco, falhas no tratamento e má conduta terapêutica tem aumentado os níveis de resistência clínica em pacientes parasitados por *Giardia lamblia*. Na França, mais de

20% dos casos de giardíase apresentam algum grau de resistência à droga (Lemeé *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001b).

Evidências clínicas em adultos e pacientes pediátricos têm demonstrado a eficácia e segurança do tinidazol no tratamento contra a giardíase, podendo ser usado em casos onde houve falhas no tratamento com o metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007). Apesar dos efeitos adversos relatados pelo uso deste fármaco, a exemplo de gosto amargo na boca, vertigem e perturbações intestinais, estes não são tão comuns como os causados pela utilização do metronidazol (Jokipii & Jokipii, 1979; 1982).

Um outro derivado dos 5-nitroimidazóis que é uma boa alternativa para o tratamento da giardíase é o ornidazol. Apesar dos poucos estudos realizados, este fármaco apresenta uma excelente eficácia, comparável ao tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1982; Bassily *et al.*, 1987; Kuzmicki & Jeske, 1994). Em um estudo *in vitro*, efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pelo ornidazol em culturas de sangue periférico humano foram sugeridos (López *et al.*, 2003). Apesar disso, efeitos colaterais raramente ocorrem em pacientes que fazem uso deste fármaco via oral (Escobedo & Cimerman, 2007).

O secnidazol também apresenta uma boa eficácia contra a giardíase, sendo rápida e completamente absorvido por via oral. Assim como o tinidazol e o ornidazol, este composto apresenta uma meia-vida longa (17-29 horas), o que permite a administração em dose única com concomitante diminuição dos efeitos colaterais em relação ao metronidazol (Gillis & Wiseman, 1996). Efeitos adversos têm sido relatados, a maioria notavelmente relacionada a distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.2. Quinacrina

A quinacrina é um derivado de acridina que foi primeiro introduzido como agente antimalárico em 1930. Somente em 1937 a eficácia deste composto foi demonstrada contra *Giardia*. Por muitos anos a quinacrina foi a droga de escolha no tratamento da giardíase, sendo substituída na década de 60 pelo metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação deste fármaco no parasito não está completamente elucidado. A diminuição do consumo de oxigênio pela interferência com componentes flavina de enzimas

como a NADH oxidase (Paget *et al.*, 1989) e inibição da síntese de ácidos nucléicos pela ligação ao DNA (Rivas *et al.*, 2000) são proposições feitas para o modo de ação desta droga. Após administração oral, a quinacrina é totalmente absorvida pelo trato intestinal, mesmo em pacientes com diarreia severa. Sua meia-vida é longa, sendo vagarosamente excretado pelos tecidos.

A toxicidade seletiva da quinacrina se deve ao fato de que a taxa de incorporação da droga no parasito é maior do que nas células do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). Este fármaco é eficaz contra cistos e também promove a redução do excistamento *in vitro*. Resistência induzida em culturas por quinacrina tem sido demonstrada, estando relacionada a uma diminuição da taxa de incorporação desta droga pelo protozoário (Upcroft *et al.*, 1996).

Efeitos colaterais deste fármaco incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, gosto amargo na boca e coloração amarelada ou alaranjada na pele e urina (Harris *et al.*, 2001). Outros efeitos relatados são hemólise em pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, psicose tóxica e exacerbação da psoríase (Gardner & Hill, 2001).

1.6.3. Furazolidona

Este derivado de nitrofurano foi descoberto em 1940, mas só em 1960 foi relatada sua atividade contra *Giardia lamblia* (Webster, 1960). Sua eficácia é menor do que a do metronidazol e quinacrina, porém sua grande vantagem consiste em sua formulação líquida, o que facilita a administração desta droga, principalmente em crianças (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação da furazolidona consiste na redução do seu grupo nitro pela NADH oxidase, cujos radicais citotóxicos causam danos aos componentes celulares, incluindo o DNA (Brown *et al.*, 1996a). Resistência está relacionada à diminuição das taxas de incorporação da droga pelo parasito e aumento dos níveis de enzimas com ciclagem tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. Podem também ocorrer reações semelhantes às causadas pelo dissulfiram após ingestão de álcool (Gardner & Hill, 2001). Efeitos mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura decorrentes do uso da furazolidona (Raipulis *et al.*, 2005).

1.6.4 Benzimidazóis

Inicialmente reconhecidos como drogas antihelmínticas, os benzimidazóis possuem um amplo espectro de ação, inclusive contra alguns protozoários (Escobedo & Cimerman, 2007). Dois membros dessa classe são utilizados no tratamento da giardíase, o albendazol e o mebendazol. Eles exercem seus efeitos pela ligação à β -tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e falhas na incorporação de glicose também ocorrem (Gardner & Hill, 2001). Cacopardo *et al.* (1995) demonstraram que a combinação albendazol-metronidazol foi 100% eficaz em portadores de *G. lamblia* resistente ao metronidazol. Uma outra vantagem relacionada ao uso do albendazol é a relativa falta de efeitos colaterais. A OMS recomenda que mulheres em período gestacional só recebam tratamento com albendazol e mebendazol a partir do terceiro mês de gestação (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.5. Paromicina

A paromicina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem sido uma alternativa eficaz e menos tóxica para gestantes infectadas por *Giardia* e em caso de cepas resistentes (Hill, 1993). O mecanismo de ação proposto para este fármaco é através da inibição da síntese protéica, interferindo nas subunidades ribossomais do parasito, que possuem tamanhos e seqüências incomuns (Katiyar *et al.*, 1994).

Após administração oral, pouco da droga é absorvida pela circulação sistêmica, atingindo altas concentrações no intestino. A maior parte da paromicina é excretada nas fezes. Em pessoas com disfunção nos rins, este fármaco pode se acumular e causar toxicidade renal (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.6. Nitazoxanida

A nitazoxanida é um 5-nitrotiazol que possui amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias, protozoários e helmintos. Estudos clínicos e *in vitro* têm confirmado a eficácia da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, no tratamento da giardíase. O mecanismo de ação é semelhante à classe dos 5-nitroimidazóis, através do grupo nitro (Adagu *et al.*, 2002). A absorção e bioviabilidade desta droga são aumentadas pela administração conjunta com alimentos (Stockis *et al.*, 2002). Uma vez fracamente absorvido pelo trato gastrointestinal, dois terços deste fármaco são expelidos pelas fezes e um terço pela urina (Broekhuysen *et al.*, 2000). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais.

1.6.7 Bacitracina complexada a sais de zinco

Este fármaco é composto de dois agentes: a bacitracina, um antibiótico produzido pela cepa Tracy-1 de *Bacillus subtilis*, e zinco, que promove estabilidade a este composto. Efeitos colaterais da bacitracina complexada a sais de zinco foram notados somente em um pequeno número de pacientes e incluem diarreia, náusea e desconforto abdominal. O uso prolongado desta droga causa problemas nefrotóxicos e distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas

O emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inapropriadas, os baixos custos e a facilidade de obtenção de determinados fármacos têm ocasionado resistência e feito com que em muitas partes do mundo, drogas como a cloroquina, penicilina e a meticilina sejam novamente utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Upcroft & Upcroft, 2001a).

Uma recente revisão do grupo dos Upcroft aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento não apenas da giardíase, como também para a amebíase e outras protozooses (Wright *et al.*, 2003).

A busca de novos fármacos para uso no combate a parasitoses intestinais vem sendo considerável. No que concerne a giardíase, diferentes drogas têm sido utilizadas, mas nenhuma é plenamente satisfatória, principalmente pela alta incidência de efeitos colaterais que justificam as contra-indicações e ocorrência significativa de falhas no tratamento. Nesse sentido, é de fundamental importância a realização de novas pesquisas em estratégias terapêuticas para a giardíase, tornando-se uma área de desenvolvimento em potencial nos próximos anos (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.7. DISSULFIRAM: NOVOS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

O dissulfiram, ou tetraetiltiuram dissulfeto, tem sido usado por mais de meio século para terapia de aversão ao álcool, através da inibição da enzima hepática aldeído desidrogenase (ALDH) (Sauna *et al.*, 2005). Sua farmacocinética tem sido extensivamente estudada, sendo considerada pela FDA e OMS uma droga segura e eficaz. Nesta última década numerosos relatos vêm sugerindo a utilização deste fármaco no tratamento do câncer e infecções fúngicas (Sauna *et al.*, 2005). A reversão do fenótipo MDR (Resistência a Múltiplas Drogas) pela inibição dos transportadores ABC, através de sua ligação com um de seus membros, a P-glicoproteína (Pgp) (Loo & Clarke, 2000; Sauna *et al.*, 2004), e seus poucos efeitos colaterais, mesmo em uso prolongado (Brewer, 1984; Chick, 1999; Brar *et al.*, 2004) fazem do dissulfiram uma droga com múltiplos alvos terapêuticos em potencial.

Recentes estudos do mecanismo pelo qual o dissulfiram exerce seus efeitos anti-álcool tem fornecido evidências para a formação de um intermediário reativo que é um potente agente carbamilante para grupos sulfidríla (Madan *et al.*, 1995). No organismo, esta droga é rapidamente e completamente reduzida a dietilditiocarbamato (DETC) (Cobby *et al.*, 1977), um conhecido inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) (Guzik *et al.*, 2005) e que forma conjugados com a *N*-acetilcisteína (NAC) (Hu *et al.*, 1997). O DETC já teve sua atividade relatada para vários protozoários parasitas, a exemplo de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e algumas espécies do gênero *Plasmodium* (Giulivi *et al.*, 1988; Bouma *et al.*, 1998; Deharo *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* possui uma larga distribuição mundial, causando síndrome da má absorção, perturbações intestinais, com dores abdominais, eliminação de fezes diarréicas e eventualmente esteatorréia. Artrite reativa também tem sido relacionada ao parasitismo por *G. Lamblia*. (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003). Vários relatos têm associado a prevalência de doenças infecciosas intestinais e status nutricional afetando ainda mais a função cognitiva, aproveitamento escolar e desenvolvimento físico de crianças (Olness, 2003).

Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, o que aumenta as taxas de prevalência nestes locais, chegando em torno de 30%, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS, 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002). Em 2004, *Giardia* foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido à sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006).

Doenças diarréicas são a causa principal de morbidade na maioria dos países em desenvolvimento (Pimentel *et al.*, 2007). A este respeito, o advento de novas drogas seguras e eficazes na terapia contra a giardíase, aliado a programas preventivos em regiões endêmicas para esta doença, poderiam reduzir consideravelmente os custos com o tratamento (Savioli *et al.*, 2006). Os impactos sócio-econômicos oriundos de políticas que promovem a saúde pública incluem uma melhor formação de recursos humanos, pela melhora do desenvolvimento cognitivo de crianças, com concomitante aumento na geração de postos de trabalho. Por consequência, haveria uma melhora na qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Nosso trabalho tem como objetivo geral o estudo do mecanismo de ação do dietilditiocarbamato (DETC) em trofozoítos de *Giardia lamblia*, objetivando uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais no tratamento contra a giardíase.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinação da suscetibilidade parasitária (IC_{50}) através de ensaios de proliferação.
- 2) Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.
- 3) Avaliação dos danos oxidativos celulares, por quantificação bioquímica da peroxidação lipídica induzida pelo DETC.
- 4) Quantificação colorimétrica de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 5) Análise por microscopia para localização da expressão de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*, através de sonda fluorescente.
- 6) Detecção de radicais livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*, pelo uso de sonda fluorescente.
- 7) Elucidação dos efeitos microbicidas do fármaco por microscopia eletrônica de transmissão, para a observação da ultraestrutura celular do parasito, possivelmente permitindo a compreensão do modo de ação do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2. Cultivo de *Giardia lamblia*

A cepa de *G. lamblia* a ser utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof^o. Dra. Frances D. Gillin, do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB são axenicamente cultivados em tubos cônicos de vidro (aproximadamente 10 mL), em meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina e 10% (volume/volume) de soro bovino inativado a 56°C por uma hora (Keister, 1983), à temperatura de 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 a 72 horas.

O meio TYI-S-33 é preparado com a seguinte composição: 19,5 mg/mL de caseína, 10,5 mg/mL de extrato de levedura, 10 mg/mL de dextrose, 2 mg/mL de cloreto de sódio, 0,6 mg/mL de fosfato de potássio monobásico, 1 mg/mL de fosfato de potássio dibásico, 2 mg/mL de L-cisteína, 1 mg/mL de bile bovina e 0,2 mg/mL de ácido ascórbico. O pH é ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1N. O meio é esterilizado em filtro a vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

4.3. Ensaio de inibição

Inóculos de 1 a 2 x 10⁵ trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DETC e/ou metronidazol, por 24 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Inóculos de 1×10^6 esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 μL de [^3H]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1 $\mu\text{Ci/poço}$, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5. Detecção de tióis totais

Inóculos de 2×10^4 trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em tubos de 15 mL por 60-72 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC e/ou metronidazol. Em seguida as células foram centrifugadas a 500 X g por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM, pH 8,2. A 20 μL da amostra foram adicionados 75 μL do mesmo tampão, 25 μL do reagente DTNB e 400 μL de metanol, sendo após centrifugado a 1500 X g por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

4.6. Lipoperoxidação

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC e/ou N-acetilcisteína (NAC). Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação a 500 X g por 10 minutos em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após centrifugação, 200 μL de 0,1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados a 200 μL de células em suspensão e incubados a 100°C por 3 horas. A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida a 532 nm e a absorbância foi comparada ao padrão obtido usando 0.1% TBA e PBS, à proporção de 1:1.

4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca/Mg, pH 7,2 por centrifugação a 500 X g por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo 25 μM da sonda 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Molecular

Probes). Após o período de incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes, montados em lâminas e observados ao microscópio de fluorescência.

4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol

Trofozoítos foram fixados por 30 min a 4°C em 1% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Para a adesão dos trofozoítos, as lamínulas foram lavadas com extran neutro, submersas em etanol 70% e secas sem contato manual. Foram colocadas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro e recobertas com solução de 0,1 % de poli-*L*-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Retirado o excesso desta solução, as lamínulas foram secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e, novamente, secas. As células aderidas por 30 minutos às lamínulas foram incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propilgalato e observadas no microscópio de fluorescência.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento com as drogas, as células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio neste tampão. Em seguida os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e infiltrados em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por 48 hs a 60°C, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 400 e contrastados em 5% de acetato de uranila e 15% de citrato de chumbo. As grades são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos estão representados como a média ± desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível

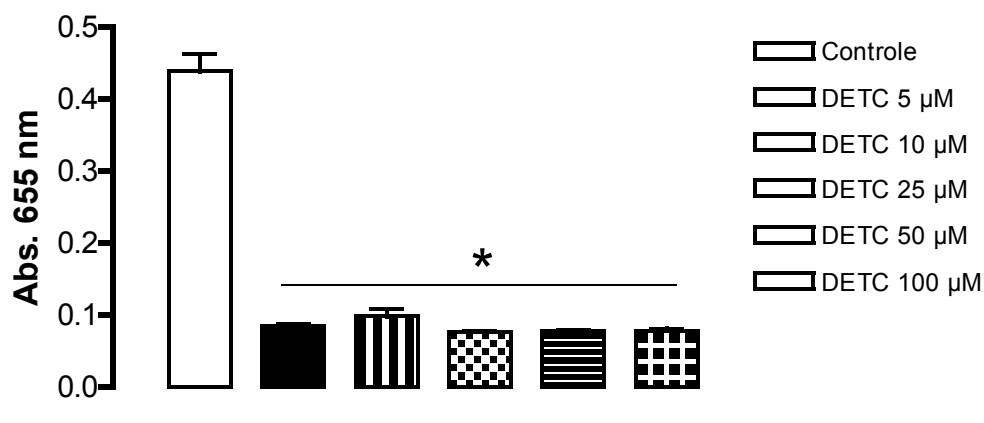
de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de *G. lamblia*

Para avaliar a atividade inibitória do DETC na proliferação celular de *G. lamblia*, nós realizamos experimentos de dose-resposta, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM , por 24 horas. O DETC diminuiu significativamente a proliferação dos trofozoítos, não havendo diferença significativa entre as concentrações utilizadas, presumivelmente por uma ausência de efeito giardicida dose-dependente nestas concentrações (Fig. 4A). O valor de IC_{50} do DETC foi aproximadamente de 2,0 μM , o que demonstra a efetividade do DETC contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, tendo seu efeito comparado ao metronidazol, com valores de IC_{50} em torno de 1,5 μM . Apesar de discreto, aparentemente há uma relação de dose-dependência para o efeito inibitório do metronidazol neste parasito nas concentrações utilizadas (Fig. 4B).

(A)



(B)

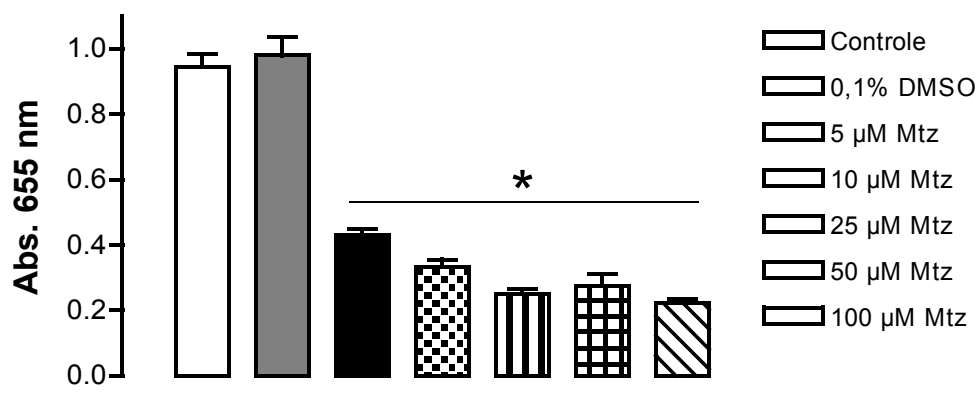


Figura 4. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular. Trofozoítos de *Giardia lamblia* expostos a diferentes concentrações de DETC e metronidazol. (A) Após 24 horas de incubação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com DETC, porém o efeito não foi dose-dependente nas concentrações testadas. (B) Em células tratadas com o metronidazol, observamos uma inibição significativa do crescimento em comparação com as células tratadas com 0,1% de DMSO, havendo uma redução dose-dependente discreta na proliferação entre 5 25 µM de concentração da droga. (*, $p < 0,001$).

5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação da concentração inibitória do DETC e metronidazol neste protozoário, nós avaliamos a associação de ambas as drogas para verificar um possível efeito sinérgico em trofozoítos de *G. lamblia*. Em células tratadas com 1 μM de DETC por 24 horas, não houve uma inibição significativa do crescimento, bem como em parasitos tratados com 1 μM de metronidazol, nas mesmas condições (Fig. 5). Quando nós fizemos as associações do DETC com o metronidazol, em diferentes concentrações de ambas e em um mesmo período de incubação, verificamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e algumas combinações, especialmente quando a concentração do metronidazol está acima de 0,5 μM , o que não ocorre quando comparamos estas combinações com o DETC ou metronidazol isoladamente (Fig. 5). Estes resultados sugerem que não há um efeito sinérgico entre estes compostos em trofozoítos de *Giardia lamblia* nas concentrações utilizadas, já que os valores de IC_{50} de ambas as drogas se encontram próximos aos valores empregados experimentalmente neste estudo.

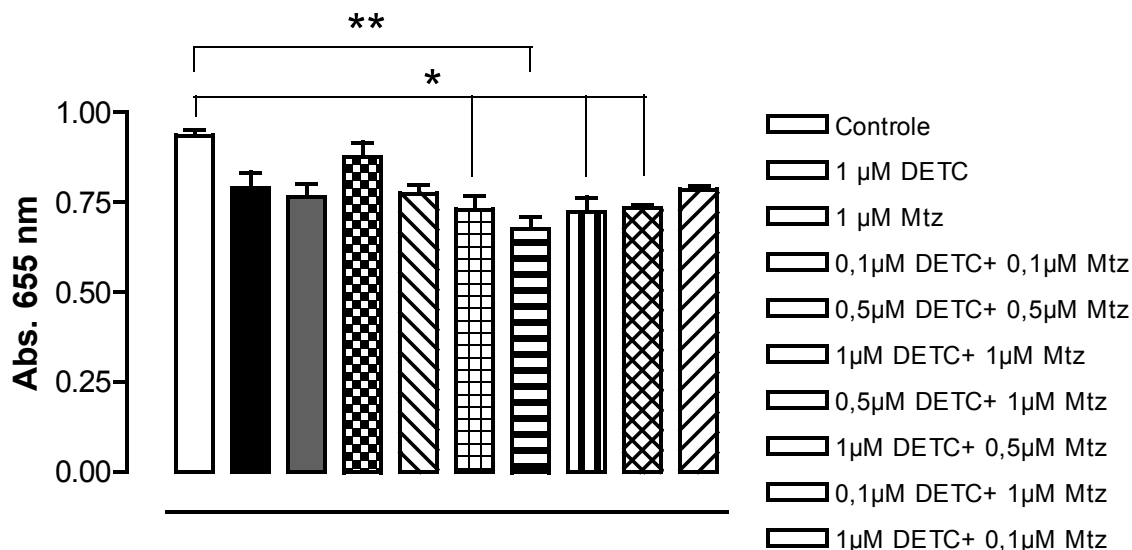


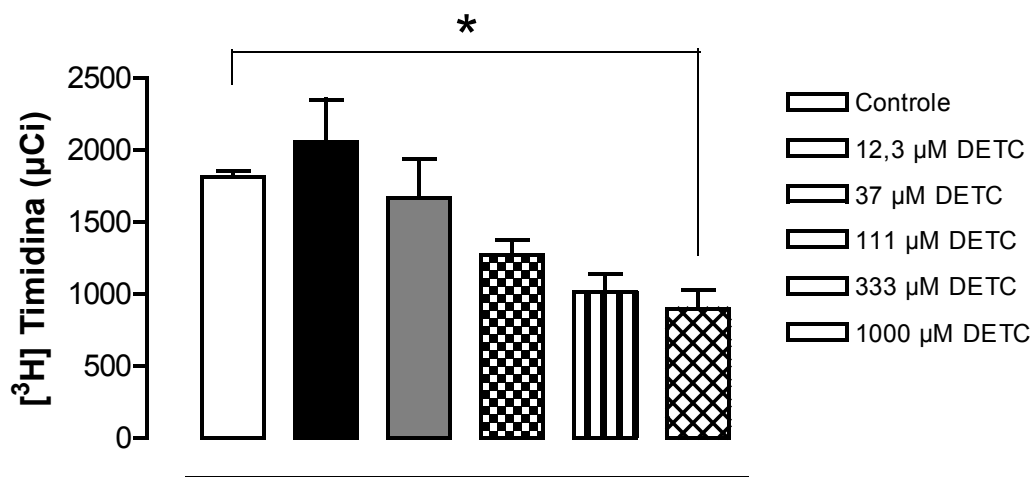
Figura 5. Avaliação de possível sinérgismo entre DETC e metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*. As células foram incubadas com ambas as drogas em diferentes combinações ou isoladamente, por 24 horas. Houve uma inibição estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

0,01) da proliferação celular em parasitos tratados com concentrações mais elevadas de ambas as drogas, porém os resultados não indicam efeito sinérgico desta associação.

5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos do DETC em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com DETC, verificamos uma diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Fig. 6A). O valor de IC₅₀ para este composto em esplenócitos foi cerca de 217 µM, muito acima dos valores encontrados para seu efeito giardicida. O metronidazol não causou citotoxicidade em esplenócitos (Fig. 6B) nas mesmas concentrações utilizadas para o DETC, sugerindo que estas células são menos suscetíveis à ação do 5-nitroimidazol em comparação ao tiocomposto. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o DETC causa seu efeito citotóxico em células do baço difere significativamente do utilizado para ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

(A)



(B)

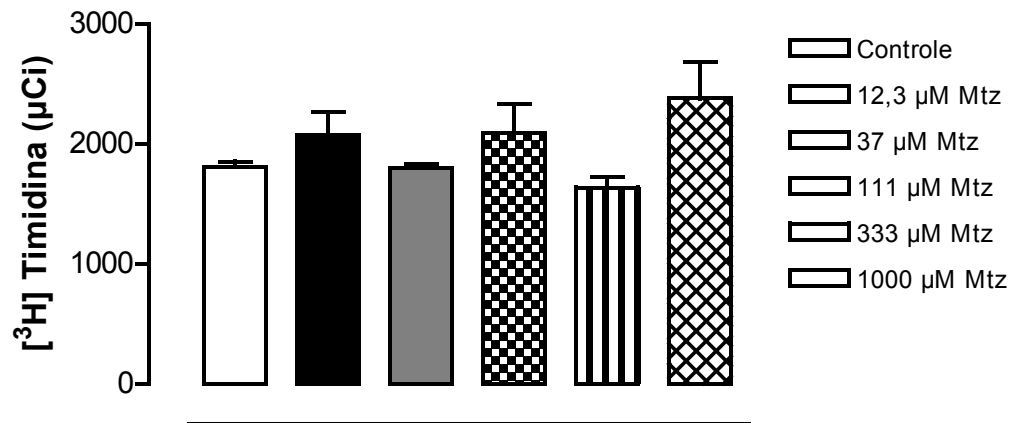


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos. Células do baço de camundongos Balb/C foram tratadas com DETC (A) ou metronidazol (B), por 24 horas. Houve uma redução da taxa de proliferação dos esplenócitos tratados com DETC, indicada pela redução da incorporação de timidina com o aumento da concentração da droga. (* $p < 0,05$). O metronidazol não reduziu a incorporação de timidina destas células, nas mesmas concentrações.

5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para verificar os possíveis efeitos causados pelo DETC neste parasito, testamos se a atividade giardicida desta substância está associada com o conteúdo dos tióis livres através da detecção pela sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA), que se liga seletivamente a grupos tiol em presença de grupamentos amino. Em parasitos controle foi observada uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de algumas células (Fig. 7A). Em parasitos tratados com DETC a 200 μ M por 24 horas, algumas células apresentavam uma marcação com intensidade menor ou ausente em comparação ao controle, indicando que o DETC está bloqueando os tióis da célula (Fig. 7C). Este resultado indica a participação dos tióis livres no efeito giardicida do composto.

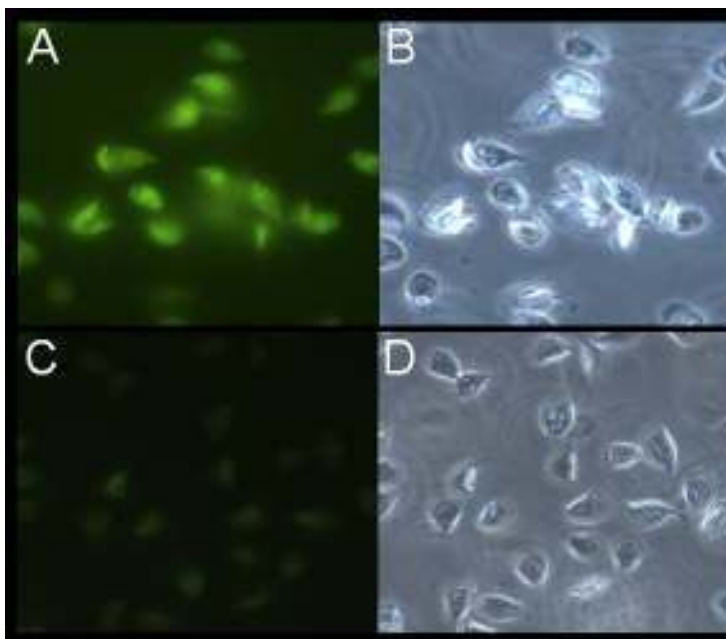


Figura 7. Análise do conteúdo de tióis livres em trofozoítos de *G. lamblia*. Detecção de grupos sulfidríla através da sonda fluorescente *orto*-phthaldialdeído (OPA – A e C). Células controle apresentam uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de alguns trofozoítos (A). Trofozoítos de *Giardia lamblia* tratados com 200 μ M de DETC por 24 horas, apresentando uma fraca marcação (C) em relação ao controle. Visualização das células por microscopia de contraste de fase (B e D).

5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com o objetivo de detectar as concentrações totais de grupos tiol presentes neste parasito, foi utilizado o reagente de Ellman (1959), que determina quantitativamente grupos sulfidril em amostras biológicas. Após 2 horas de incubação com 100 μM de DETC, foi possível observar um decréscimo do conteúdo de grupamentos tiol totais em comparação ao controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Fig. 8). O metronidazol nas mesmas concentrações não levou à diminuição destes grupos sulfidril, com níveis de detecção comparáveis aos do controle. Quando as células foram incubadas com a associação de ambos, observamos uma diminuição da expressão de grupamentos tiol, porém houve um discreto aumento em comparação ao DETC. Estes resultados sugerem que o DETC diminui a capacidade antioxidante de *G. lamblia* através do decréscimo da expressão de grupos tiol presentes neste parasito, não havendo efeitos aditivos ou sinérgicos entre os compostos.

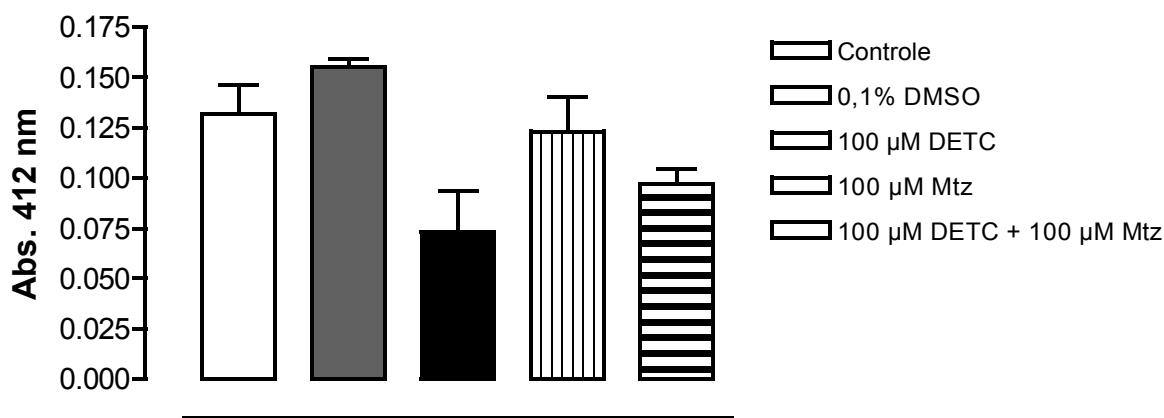


Figura 8. Quantificação dos grupos sulfidril em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Houve uma diminuição dos níveis de tióis totais em células tratadas com 100 μM de DETC por 2 horas em relação ao controle, porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Parasitos tratados com metronidazol apresentaram valores semelhantes ao controle e a combinação do DETC com o metronidazol levou a um discreto aumento dos níveis de tióis livres em comparação ao DETC.

5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação dos tióis livres, nós avaliamos a participação destes grupamentos na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*. Em células tratadas com 25 μM de DETC por 24 horas, observamos um decréscimo na proliferação celular em relação às células controle (Fig. 9). A adição de 25 μM de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultura não afetou a proliferação do parasito *in vitro*. A incubação das células com DETC e NAC, ambos a 25 μM , levou à reversão parcial do efeito giardicida do DETC, aumentando discretamente à medida que elevamos a concentração do NAC (Fig. 9). Estes dados indicam que o efeito do DETC nestas células está associado, ao menos parcialmente, com os grupamentos tiol presentes neste parasito, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, já que a NAC não foi capaz de reverter totalmente os efeitos causados pelo DETC.

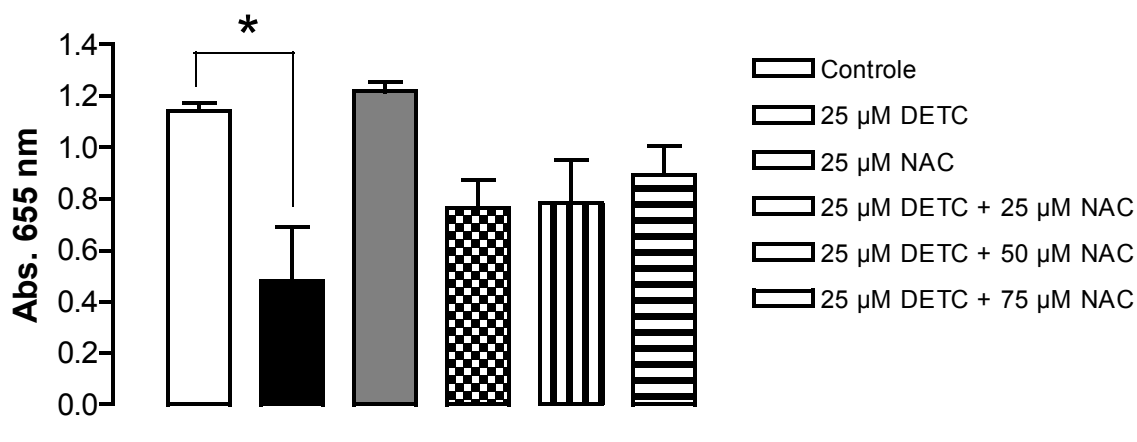
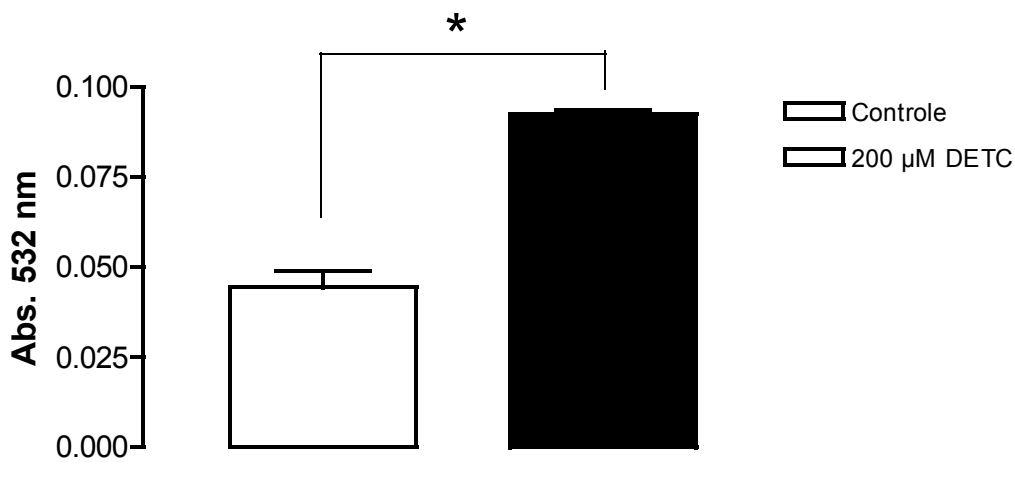


Figura 9. Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de *Giardia* em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC). Células tratadas com 25 μM de DETC apresentaram uma redução na proliferação em comparação ao controle (*, $p < 0,05$). Quando associamos o NAC ao DETC em diferentes proporções há uma reversão parcial do efeito inibitório do DETC.

5.7. Quantificação de lipoperoxídeos em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com a observação de que o DETC é capaz de diminuir os níveis de tióis livres neste parasito e por conseqüência a sua capacidade antioxidante, decidimos verificar os danos oxidativos celulares através da quantificação bioquímica da peroxidação lipídica através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas, houve um aumento significativo desta lipoperoxidação (Fig. 10A). A associação do DETC com a NAC foi capaz de reverter a lipoperoxidação causada pelo DETC (Fig. 10B). Estes dados sugerem que o DETC está elevando o estresse oxidativo, sendo este efeito modulado por cisteína, possivelmente pela interação destas duas moléculas com conseqüente inibição da atividade do DETC.

(A)



(B)

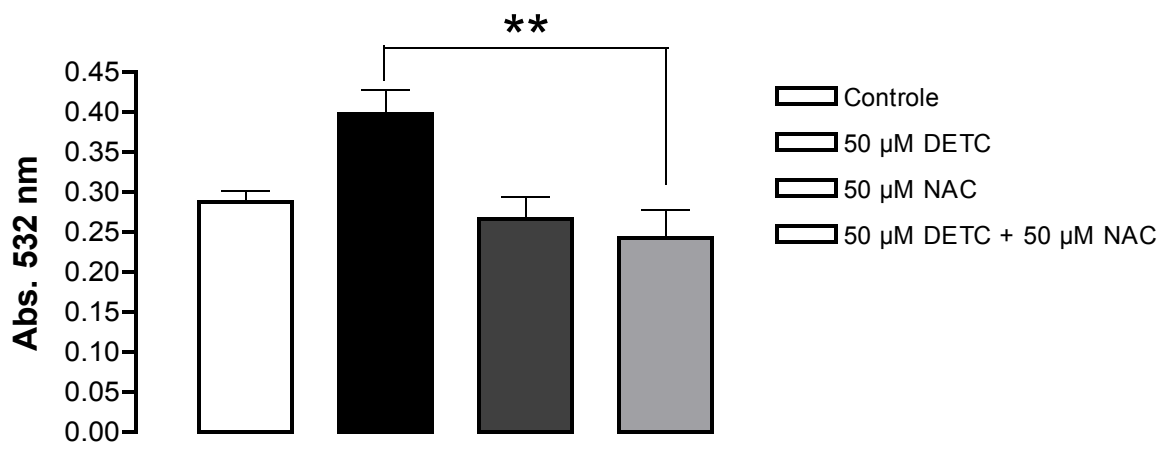


Figura 10. Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle (t de Student, * $p < 0,001$). (B) Houve uma reversão dos efeitos do DETC quando foi realizado o co-tratamento com a NAC, em parasitos tratados por 2 horas (** $p < 0,05$).

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Como um dos efeitos do DETC é o aumento dos danos oxidativos celulares em trofozoítos de *Giardia*, resolvemos em seguida avaliar a produção espécies reativas através da sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes), que é permeável à membrana celular, se tornando impermeável no espaço intracelular quando se liga a espécies reativas de oxigênio, emitindo fluorescência. A maioria das células controle estavam viáveis, com grande motilidade ou aderidas à lâmina de vidro, não apresentando marcação para a sonda (Fig. 11A - B). Os trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora se encontravam menos móveis e com alterações morfológicas na superfície celular. Nestas células observou-se uma marcação homogênea (Fig. 11C), um pouco mais pronunciada em regiões de protuberância membranosa, conhecidas como “blebs” (Fig. 11D). Assim como no controle, as células tratadas com 200 µM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação para a sonda. Isto provavelmente se deve ao fato de que a grande maioria destas células já estavam mortas, não sendo possível a detecção da sonda intracelularmente (Fig. 11E - F).

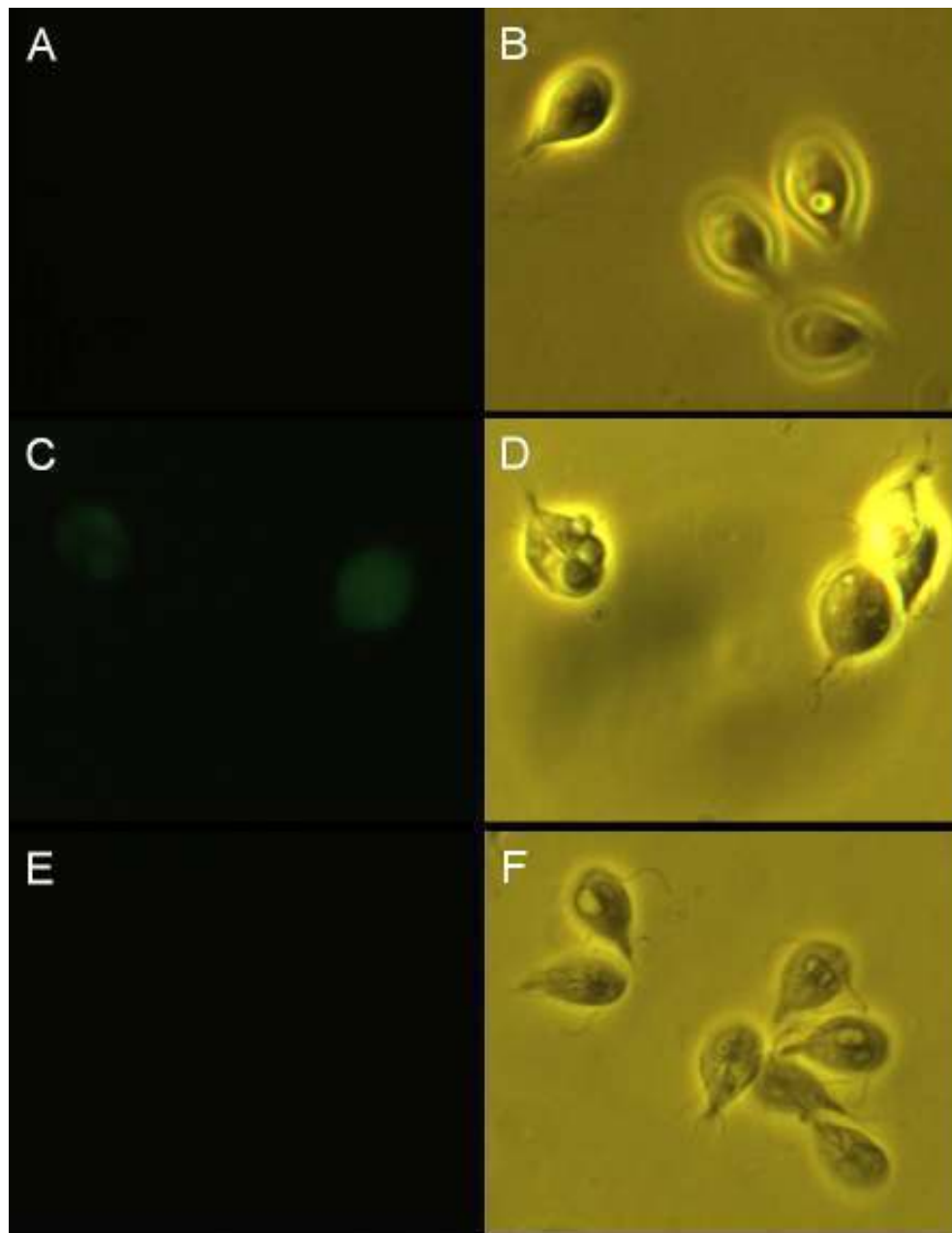


Figura 11. Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia*. A sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para detecção de espécies reativas neste parasito. Células controle não apresentaram marcação. (A e B) O tratamento com 100 μM de DETC por 1 hora levou ao aparecimento de células com alterações morfológicas (D) e marcadas com a sonda fluorescente (C). Trofozoítos tratados com 200 μM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação com H₂DCFDA (E), possivelmente porque estas já estavam mortos (F).

5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC

Para entender melhor os efeitos do DETC em trofozoítos de *G. lamblia*, nós incubamos as células em presença ou ausência de 200 μM desta substância por 24 horas e depois de processadas, foram visualizadas em MET. As células controle apresentavam-se íntegras com uma grande quantidade de partículas de glicogênio e cisternas de retículo endoplasmático distribuída pelo citoplasma (Fig. 12A). Vesículas periféricas foram observadas subjacentes à membrana plasmática (Fig. 12B). Nestas células também podemos verificar em corte transversal estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos, o funis (Fig. 12C) e o disco adesivo (Fig. 12D). Os núcleos, presentes na região anterior dos parasitos, encontravam-se homogêneos, bem delimitados pela membrana nuclear (Fig. 12D). Em parasitos tratados com DETC, mais de 50% das células apresentavam-se com alto grau de extração citoplasmática, inclusive do conteúdo nuclear (Fig. 13A). Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito (Fig. 13B), sugerido pela presença de estruturas virguliformes ou com dupla membrana circunscrevendo porções citoplasmáticas. Possível participação do retículo endoplasmático é sugerida, já que este se encontrava dilatado e próximo às vesículas (Fig. 13C), que também se apresentaram maiores e menos numerosas do que no controle, sugerindo a ocorrência de confluência das mesmas (Fig. 13D).

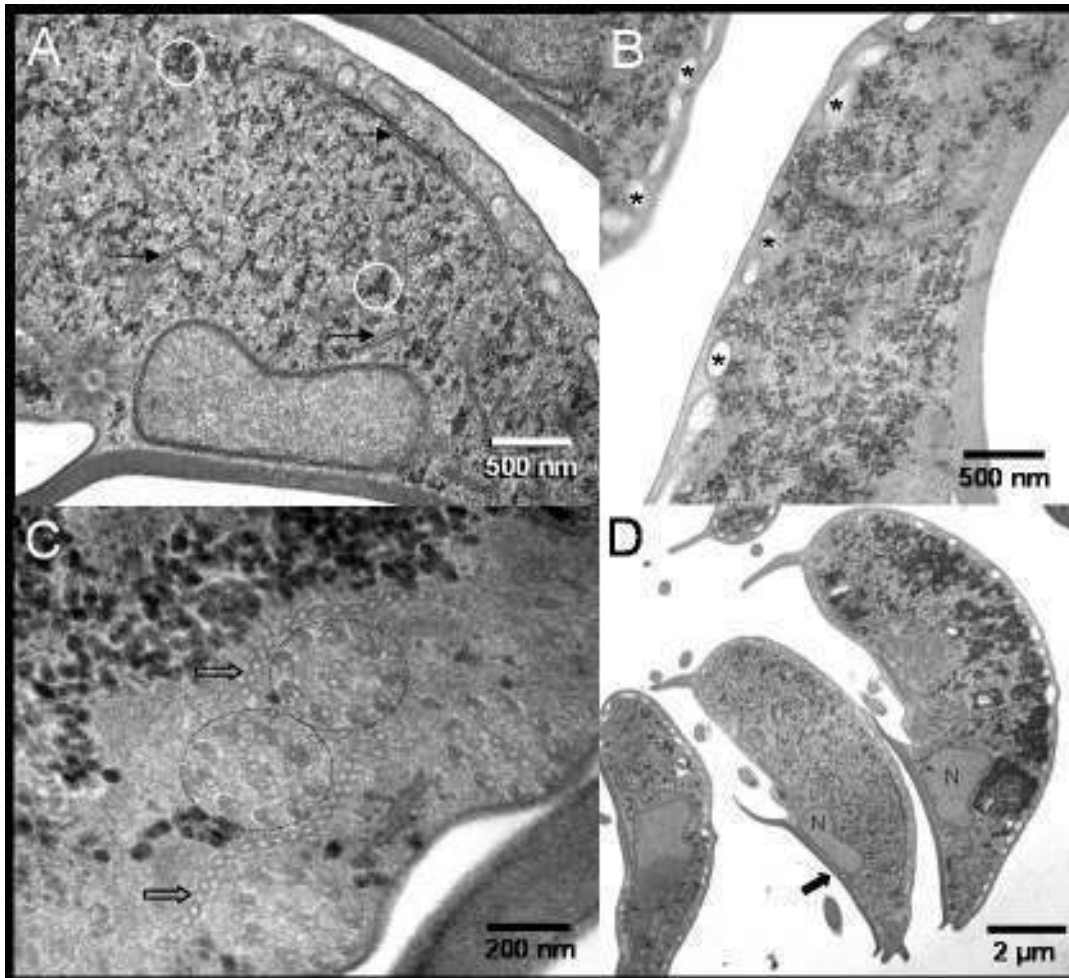


Figura 12. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células controle apresentando citoplasma homogêneo, com grânulos de glicogênio (assinalado por círculos brancos) e retículo endoplasmático (setas). Em (B), visualizamos as vesículas periféricas (*) na região dorsal da célula. (C) Estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (assinalados por círculos pontilhados) e o corpo funis (setas). Em (D), observamos células em corte longitudinal apresentando núcleos (N) e o disco adesivo (seta).

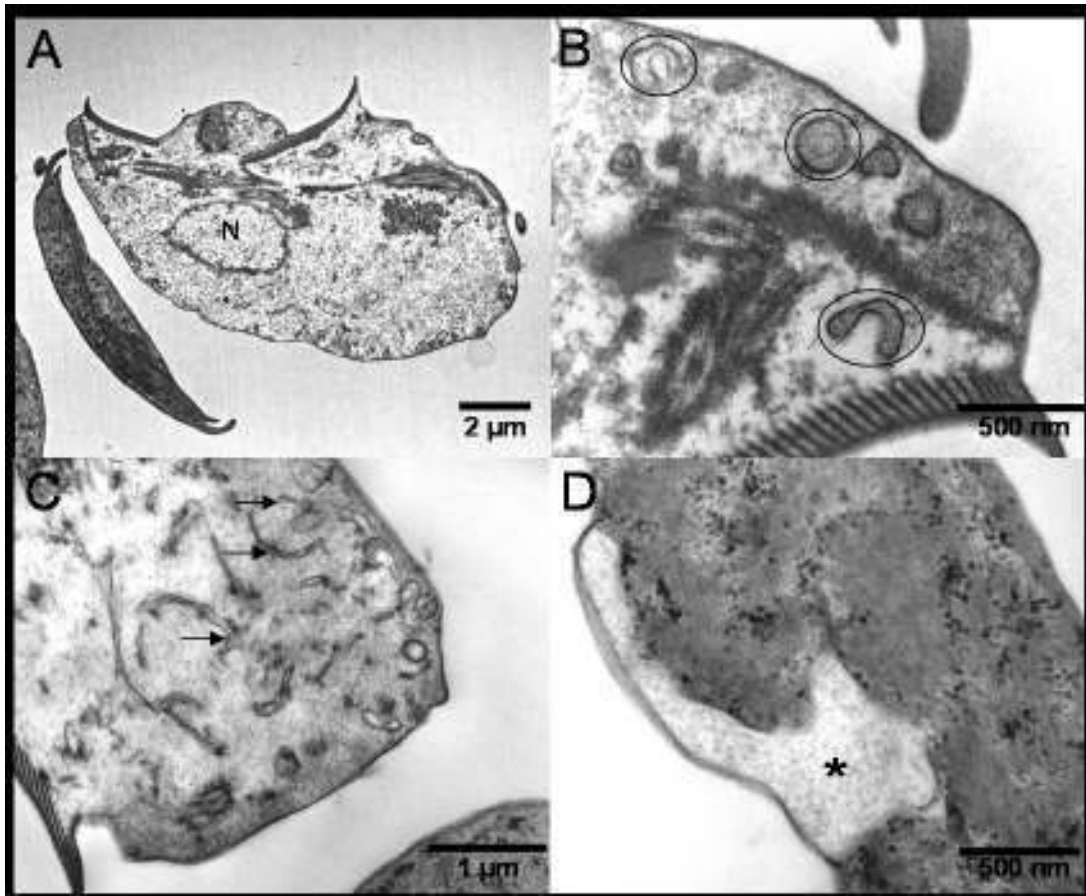


Figura 13. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *G. lamblia* tratados com DETC. (A) Células tratadas com 200 µM de DETC por 24 horas apresentando reduzida eletrondensidade de citoplasma e nucleoplasma, em comparação às células controle (Fig. 12). (B) Visualização de vesículas virguliformes ou com dupla membrana (assinaladas por círculos), sugerindo possíveis processos autofágicos. Em (C), observamos este mesmo processo, com provável participação do retículo endoplasmático, que se encontra mais dilatado quando comparado ao controle. Em (D), visualizamos uma célula apresentando grande compartimento alongado, presumivelmente formado pela fusão homofílica das vesículas periféricas.

6. DISCUSSÃO

A elucidação dos efeitos do DETC, um conhecido inibidor de SOD, é de importância fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em sua atividade giardicida, já que a ausência de SOD em *Giardia* nos permite evidenciar a existência de efeitos independentes desta enzima, produzidos pela ação do DETC em protozoários parasitas.

Apesar de ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, a inibição da proliferação celular pelo DETC aparentemente não é dose-dependente. Uma das possíveis explicações para este fato é que esta substância pode ser oxidada de forma muito rápida, principalmente em soluções, perdendo parte da sua atividade. Outra possibilidade é que o composto atue sobre um limitado “pool” de resíduos de cisteína, assim o efeito atingiria um plateau ao reagir com os grupos SH disponíveis. A manipulação deste composto precisa ser feita com presteza, evitando sua exposição ao ar e/ou aumento da temperatura. Embora seja uma droga relativamente instável, seu efeito giardicida é bastante satisfatório, com níveis comparáveis ao do metronidazol *in vitro*.

O dissulfiram, medicamento utilizado no tratamento contra o alcoolismo, age como um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Brien & Loomis, 1985). Este fármaco sofre rápida redução enzimática no sangue pela glutatona redutase (Strömme, 1963; Cobby *et al.*, 1977), mas pode também ser reduzido de forma não enzimática pela albumina (Agarwal *et al.*, 1983). Subseqüentemente, DETC é metabolizado por tiol metiltransferase ou tiopurina metiltransferase a DETC-Me (Gessner & Jakubowski, 1972; Glauser *et al.*, 1993; Lill *et al.*, 1996), que sofre oxidação principalmente pelo citocromo P-450, com uma contribuição minoritária de flavina monooxigenases (Johansson *et al.*, 1989). Os metabólitos oxidados do dissulfiram têm sido descritos como potentes inibidores da ALDH, através da carbamilação de um grupo tiol crítico no sítio ativo da enzima (Jin *et al.*, 1994; Tonkin *et al.*, 2003).

Por ser reduzido rapidamente *in vivo* a DETC, o dissulfiram se torna uma poderosa ferramenta quimioterápica no tratamento contra a giardíase. Este fármaco já foi testado *in vitro* e *in vivo* contra *Giardia lamblia* (Nash & Rice, 1998), com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para o DETC com trofozoítos *in vitro*.

Quando analisamos a associação do DETC com o metronidazol, verificamos que não houve um efeito sinérgico entre estas duas drogas. Em *Entamoeba histolytica*, o metronidazol é

capaz de se ligar covalentemente a algumas proteínas específicas, incluindo superóxido dismutase e tioredoxina redutase, esta última sendo uma das responsáveis pela ativação do metronidazol neste protozoário através da redução do grupo nitro (Leitsch *et al.*, 2007). Além disso, os níveis de cisteína são reduzidos com a adição do metronidazol, provavelmente pela reação desta droga com os grupos sulfidríla acessíveis neste parasito (Leitsch *et al.*, 2007). Como a tioredoxina redutase é uma enzima muito comum, é provável que processos similares ocorram em outros organismos procarióticos e/ou eucarióticos. Nesse sentido, o efeito giardicida do DETC e metronidazol pode estar associado à competição de ambas as drogas pelos mesmos mecanismos de ativação em *Giardia lamblia*, que apresenta uma enzima semelhante à tioredoxina redutase, a dissulfeto redutase (Brown *et al.*, 1996b) e proteínas ricas em cisteína (Luján & Nash, 1994). Em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, o mecanismo deste 5-nitroimidazol está relacionado à sua redução pela piruvato:ferredoxina oxidorreductase a radicais citotóxicos que levam a danos irreversíveis e morte celular (Müller, 1986). Apesar disso, resistência ao metronidazol em *E. histolytica* pode ser atribuída à diminuição de enzimas antioxidantes, como peroxiredoxina (Wassmann *et al.*, 1999) e superóxido dismutase (Samarawickrema *et al.*, 1997), assim como em *G. lamblia*, onde o aumento da atividade da enzima NADH oxidase tem sido associado a cepas resistentes ao metronidazol (Ellis *et al.*, 1993).

Alguns trabalhos têm desencorajado a utilização do dissulfiram e metronidazol em associação, principalmente pelo acúmulo de acetaldeído causado pela inibição da enzima ALDH por estes fármacos (Gardner & Hill, 2001) em pacientes que fazem ingestão de álcool, levando ao efeito “antabuse” (sensação de calor, náusea, vômitos e taquicardia) (Finegold, 1980; Edwards *et al.*, 1986; Krulewitch, 2003). A utilização destas duas drogas em conjunto poderia potencializar este efeito, além de causar em alguns pacientes reações psicóticas, conforme alertado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu bulário eletrônico.

Quando analisamos a incorporação de timidina por células do baço na presença de diferentes concentrações de DETC ou metronidazol, observamos que não houve uma diferença significativa nos níveis de incorporação entre as células controle e tratadas com o metronidazol. No entanto, o DETC apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas concentrações acima de 111 μM . Apesar disso, o valor de IC_{50} encontrado para trofozoítos de *Giardia* (*i.e.* 2 μM) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A farmacocinética e os efeitos colaterais do dissulfiram têm sido extensivamente estudados, gerando dados para a elaboração de formulações e regimes terapêuticos apropriados. Sua biodisponibilidade é maior que 80% após administração oral e a eliminação do dissulfiram e seus metabólitos é um processo lento. Aproximadamente 20% da droga permanece no corpo após 1 a 2 semanas (Ellenhorn *et al.*, 1997 *apud* Sauna *et al.*, 2005). Apesar de ser recomendado o monitoramento de pacientes que usam altas doses do dissulfiram (acima de 250 mg por dia) (Fuller & Gordis, 2004), existem poucos efeitos colaterais associados com longos períodos de tratamento. Hepatotoxicidade é a causa mais comum de preocupações durante a utilização do dissulfiram (Sauna *et al.*, 2005), contudo este efeito adverso é geralmente reversível quando seu uso é interrompido na presença de manifestações clínicas (Wright *et al.*, 1988). A excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais graves tornam o dissulfiram uma droga segura e eficaz, inclusive com aprovação pela FDA e ANVISA.

A redução nos níveis de grupamentos tiol em trofozoítos tratados com DETC foi observada tanto por microscopia de fluorescência, quanto pela avaliação quantitativa através do reagente de Ellman (DTNB). Estes resultados sugerem que o DETC esteja carbamitando e/ou formando pontes dissulfeto com grupamentos tiol livres que estão presentes em *Giardia* e que são responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito, a exemplo das proteínas ricas em cisteína e dissulfeto redutase. De modo interessante, a atividade do dissulfiram em trofozoítos de *G. lamblia* foi reduzida pela adição de cisteína ao meio (Nash & Rice, 1998), sugerindo que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga. O metronidazol também reduziu os níveis de tióis totais em *Giardia*, porém não houve diferenças entre o tratamento com as drogas feito isoladamente ou em conjunto.

Cepas de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol estão associadas a um aumento da atividade da enzima NADH oxidase, possibilitando a detoxificação de espécies oxidativas (Ellis *et al.*, 1993). É provável que cepas sensíveis ao metronidazol sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, já que estas apresentam diminuição do consumo de O₂ (Ellis *et al.*, 1993), com possível redução dos níveis de grupos sulfidril livres, que podem ser oxidados através da ativação do grupo nitro deste fármaco.

Para confirmar o papel dos grupamentos tiol no efeito giardicida do DETC, nós incubamos os trofozoítos de *Giardia* em concentrações crescentes de NAC, associadas ou não a este composto. Não houve diferenças significativas entre células tratadas com 25 µM de NAC e o

grupo controle, porém houve uma diminuição significativa da proliferação celular quando adicionamos 25 μ M de DETC ao meio de cultura. A pré-incubação do NAC com o DETC na proporção 1:1 reverteu parcialmente a inibição, aumentando discretamente à medida que esta proporção de NAC foi aumentada. A presença de resíduos de cisteína tem sido enfatizada na literatura como um fator de crescimento essencial para *Giardia lamblia* (Luján & Nash, 1994), conferindo proteção contra os efeitos letais do oxigênio (Fairlamb, 1989). As análises de incorporação de L-cisteína por este parasito indicam a presença de ao menos dois sistemas de transporte. L-cistina não foi incorporada pelos trofozoítos, sugerindo a ausência de um sistema de transporte e a especificidade dos transportadores de cisteína. *Giardia* não é capaz de sintetizar cisteína ou metionina a partir de sulfato, nem de converter metionina em cisteína, sendo assim o protozoário é auxotrófico para este aminoácido (Luján & Nash, 1994).

As CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície (VSPs), são os principais antígenos de *Giardia lamblia*. Cerca de 150 diferentes genes que codificam estas proteínas tem sido identificados no genoma deste parasito. Somente uma VSP é expressa por trofozoíto, permitindo que *Giardia* mude a expressão desta proteína em sua superfície (Nash, 2002). O mecanismo desta variação antigênica ainda não está claro, mas este não envolve rearranjo de DNA e é refletido por mudanças na expressão gênica em nível de RNA mensageiro (Nash, 2002). Diferenciação pode induzir variação antigênica *in vitro* (Svärd *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002;) e *in vivo* (von Allmen *et al.*, 2004). Análises de anticorpos IgA anti-*Giardia* em leite materno de mães que vivem em área endêmica de giardiase, provavelmente com múltiplas infecções com diferentes cepas de *Giardia*, revelou que as VSPs são as proteínas imunorreativas dominantes (Téllez *et al.*, 2005).

Estes dados nos indicam que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga, apesar de não ser o único. Em 1930, o dissulfiram começou a ser utilizado como escabicida e vermífico por ser um quelante de cobre, um componente essencial da cadeia respiratória de artrópodes e helmintos (Eneanya *et al.*, 1981). A atividade quelante de metal também é relatada para o DETC, que é um específico inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (Pritsos *et al.*, 1989; Majid & Nishiyama, 2002). As proteínas com motivos dedo de zinco são essenciais para o funcionamento celular normal (Berg & Shi, 1996), tornando-se um importante alvo terapêutico (Rein *et al.*, 1997). *Giardia* expressa altos níveis de CRP na superfície, as quais

possuem motivos de zinco (Luján *et al.*, 1995c). O zinco pode ser quelado pelo DETC, se apresentando como uma outra via de atuação desta droga neste parasito.

Os danos oxidativos celulares em membranas de trofozoítos tratados com DETC foram avaliados através da formação de um produto citotóxico, o malondialdeído (MDA), que se liga ao TBA gerando uma reação colorimétrica indicativa da peroxidação lipídica (Bellé *et al.*, 2004). Houve um aumento significativo da lipoperoxidação em parasitos tratados com 200 µM DETC, por 4 horas. O metronidazol levou a um aumento discreto da peroxidação lipídica e a associação entre o DETC e o metronidazol não elevou significativamente a peroxidação, com níveis comparáveis ao DETC utilizado isoladamente, provavelmente porque a concentração do DETC já estava alta, levando ao plateau da peroxidação celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, no entanto as membranas são um dos componentes mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997). Este processo pode levar à morte celular através de alterações na estrutura e permeabilidade de membrana, levando à perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas (Hershko, 1989). O NAC foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do DETC, demonstrando a importância dos grupos tiol no mecanismo de ação desta droga.

Baseado na confirmação de que o DETC promove lipoperoxidação, provavelmente pelo aumento da geração de radicais livres de oxigênio, resolvemos avaliar a produção de espécies reativas por esta droga em *Giardia lamblia* com a sonda fluorescente H₂DCFDA. As células controle não apresentaram marcação para a sonda, enquanto que trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora foram marcados de forma homogênea, demonstrando que este tiocomposto está aumentando a formação de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Isto se deve ao fato de que a redução de grupos sulfidril livres pode estar afetando o potencial redutor deste parasito, levando ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo não pôde ser visualizado em células tratadas com 200 µM de DETC, possivelmente porque estas já se encontravam mortas.

Os metabólitos mais comuns produzidos pela utilização do oxigênio em organismos aeróbicos são o radical superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que participa da reação que produz o radical hidroxila (OH[•]), sendo este último extremamente reativo (Cadenas, 1989). Superóxido é usualmente detoxificado pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água por catalase, peroxidase e a enzima dependente de glutatona, glutatona

peroxidase (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). Além destas enzimas de detoxificação convencionais, mecanismos alternativos podem ser utilizados para diminuição do estresse oxidativo celular, que incluem as dioxigenases e monooxigenases (citocromo P-450 redutase) (Malmström, 1982). Algumas oxidases dependentes de flavina (NADH oxidase) reduzem tetravalentemente o oxigênio a água, abolindo a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em bactérias anaeróbicas (Schmidt *et al.*, 1986), assim como a NADH peroxidase, uma flavoenzima envolvida na redução do peróxido que também desempenha papel antioxidante em algumas células (Stanton & Jensen, 1993).

Alguns protozoários microaerófilos também possuem NADH oxidase. *Entamoeba histolytica* contém uma NADPH oxidase dependente de flavina que produz peróxido quando purificada (Lo & Reeves, 1980). *Trichomonas vaginalis* contém uma flavo-oxidase que produz água, além de uma NADPH oxidase produtora de peróxido (Linstead & Bradley, 1988). *Giardia* também apresenta atividades oxidase e peroxidase dependentes de NADH (Brown *et al.*, 1996a; Brown *et al.*, 1998), responsáveis pela capacidade deste parasito de detoxificar o oxigênio. As principais enzimas de detoxificação de espécies oxidantes, como a SOD, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase não estão presentes neste protozoário, salientando a importância da manutenção de um ambiente intracelular redutor através da ciclagem redox pelos grupos sulfidríla presentes em *Giardia*.

A elucidação dos efeitos microbicidas do DETC foi possibilitada pela microscopia eletrônica de transmissão, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 200 μM de DETC por 24 horas, houve um alto grau de extração citoplasmática, apresentada por mais de 50% das células. Este efeito é causado provavelmente pelo colapso do potencial de membrana, com conseqüente rompimento da membrana plasmática pelo aumento do estresse oxidativo (Lloyd *et al.*, 2000), onde a indução de radicais livres de oxigênio leva a uma inativação de sistemas que consomem oxigênio, acúmulo de peróxido de hidrogênio e oxidação de grupos tiol.

Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito, sugeridos pela presença de estruturas virguliformes ou com membrana dupla, que são semelhantes à formação dos vacúolos em organismos eucariotos (Suzuki & Ohsumi, 2007; Xie & Klionsky, 2007).

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento de sua homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Os mecanismos

envolvem a formação de uma estrutura de dupla membrana dentro da célula, chamada de vacúolo autofágico ou autofagossomo, a partir do retículo endoplasmático e vias secretórias iniciais. A fusão com o lisossomo gera o autofagolisossomo, onde as enzimas hidrolíticas agem na degradação do conteúdo interno (Shintani & Klionsky, 2004). Resposta a condições de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismos de autofagia. É possível que *Giardia* também utilize destes mecanismos para evitar a perda da homeostasia com o aumento do estresse oxidativo, como ocorre em outros tipos celulares (Hill *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

A observação de vesículas que se encontravam maiores e menos numerosas em comparação ao controle nos leva a crer que ocorreu a fusão homofílica destes compartimentos. Este processo pode ter sido mediado por pontes dissulfeto que se formam pela ação do DETC entre as cisteínas das proteínas celulares, conferindo uma modificação da conformação tridimensional à molécula, expondo sítios de reconhecimento e/ou catalíticos e ocasionando uma série de alterações na morfologia e funcionamento normais da célula.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem do estresse oxidativo e conteúdo de grupos tiol podem prover valiosas estratégias terapêuticas para a giardíase.

7. CONCLUSÕES

7.1. O DETC mostrou-se efetivo na inibição da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, porém este efeito aparentemente não é dose-dependente;

7.2. A associação do DETC com o metronidazol não levou a um efeito sinérgico *in vitro*;

7.3. O DETC promove a redução dos níveis de grupos sulfidrila livres, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto e/ou carbamilações em moléculas ricas em cisteína que estejam com estes grupamentos tiol acessíveis, como as CRPs, uma das responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito;

7.4. O aumento do estresse oxidativo em trofozoítos de *G. lamblia* pode ser devido à diminuição da capacidade antioxidante deste protozoário, inviabilizando a sua sobrevivência;

7.5. Os resultados apresentados neste trabalho apontam para uma nova abordagem na terapia contra a giardíase. Estudos para avaliação dos efeitos do DETC *in vivo* se colocam como perspectivas em nosso trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ADAGU, I.S., NOLDER, D., WARHURST, D.C., ROSSIGNOL, J.F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, 49:103-11, 2002.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, 14: 447-75, 2001.

AGARWAL, R.P., MCPHERSON, R.A., PHILLIPS, M. Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 42: 293-310, 1983.

AL-MEKHLAFI, M.S., AZLIN, M., NOR AINI, U., SHAIK, A., SA'IAH, A., FATMAH, M.S., ISMAIL, M.G., AHMAD FIRDAUS, M.S., AISAH, M.Y., ROZLIDA, A.R., NORHAYATI, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 686-91, 2005.

APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, 21: 370-6, 2005.

BASSILY, S., FARID, Z., EL-MASRY, N.A., MIKHAIL, E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J Trop Med Hyg**, 90: 9-12, 1987.

BELLÉ, N.A., DALMOLIN, G.D., FONINI, G., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 22: 245-51, 2004.

BENCHIMOL, M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett**, 1:81-7, 2004.

BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, 511: 133-44, 2002.

BERG, J.M., SHI, Y.. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, 23: 1081-5, 1996.

BERNANDER, R., PALM, J.E., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol**, 3: 55-62, 2001.

BIAGINI, G.A., PARK, J.H., LLOYD, D., EDWARDS, M.R. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. **Microbiology**, 147: 3359-65, 2001.

BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharm. J**, 234: 271-4, 1991.

BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J.P. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**, 42: 817-20, 1998.

BRAR, S.S., GRIGG, C., WILSON, K.S., HOLDER, W.D., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A.J., WHORTON, A.R., STOWELL, G.W., WHITTALL, L.B., WHITTLE, R.R., WHITE, D.P., KENNEDY, T.P.. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol Cancer Ther.** 3: 1049-60, 2004.

BREWER, C. How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. **Br J Psychiatry**, 144: 200-2, 1984.

BRIEN, J.F., TAM, G.S., CAMERON, R.J., STEENAART, N.A., LOOMIS, C.W. A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrazolethiol, calcium carbimide, and disulfiram. **Can J Physiol Pharmacol**, 63: 438-43, 1985.

BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., EDWARDS, M.R., UPCROFT, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Eur J Biochem**, 1:155-61, 1996a.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 20: 211-20, 1996b.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 72: 47-56, 1995.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 61: 155-8, 1993.

BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, 125: 11-9, 2002.

BUSATTI, H.G., GOMES, M.A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, 101: 819-21, 2007.

CACOPARDO, B., PATAMIA, I., BONACCORSO, V., DI PAOLA, O., BONFORTE, S., BRANCATI, G. Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole-resistant giardiasis **Clin Ter**, 146: 761-7, 1995.

CADENAS, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. **J Biolumin Chemilumin**, 4: 208-18, 1989.

CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Bras. Soc. Med. Trop**, 28: 25-31, 1995.

CARRANZA, P.G., FELTES, G., ROPOLO, A., QUINTANA, S.M., TOUZ, M.C., LUJÁN, H.D. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. **Infect Immun**, 70: 5265-8, 2002.

CHICK, J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. **Drug Saf**, 20: 427-35, 1999.

CHIEN, C.T., SHYUE, S.K., LAI, M.K. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. **Transplantation**, 15: 1183-90, 2007.

CIMERMAN, B., CURY, F.M., MORENO, C.T. Avaliação terapêutica do secnidazol dose única no tratamento da giardíase em crianças. **Pediatr. Mod**, 6: 1008-1012, 1994.

COBBY, J., MAYERSOHN, M., SELLIAH, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, 202: 724-31, 1977.

CRUZ, C.C., FERRARI, L., SOGAYAR, R. A therapeutic trial in *Giardia muris* infection in the mouse with metronidazole, tinidazole, secnidazole and furazolidone **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 223-8, 1997.

DA COSTA-MACEDO, L.M., MACHADO-SILVA, J.R., RODRIGUES-SILVA, R., OLIVEIRA, L.M., VIANNA, M.S. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum communities of the city of Rio de Janeiro, Brazil **Cad Saude Publica**, 14: 851-5, 1998.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIN, J., LECLAIRE, C. Treatment of giardiasis (lambliasis) with metronidazole. Apropos of 100 cases. **Presse Med**, 6: 15-6, 1962.

DEHARO, E., BARKAN, D., KRUGLIAK, M., GOLENSER, J., GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. **Biochem Pharmacol**, 1: 809-17, 2003.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, 45: 2471-6, 1986.

- DUREL, P., ROIRON, V., SIBOULET, A., BOREL, L.J. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. **Br J Vener Dis**, 36: 21-6, 1960.
- ECKMANN, L., LAURENT, F., LANGFORD, T.D., HETSKO, M.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F., GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol**, 1: 1478-87, 2000.
- EDWARDS, D.L., FINK, P.C., VAN DYKE, P.O. Disulfiram-like reaction associated with intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole and metronidazole. **Clin Pharm**, 5: 999-1000, 1986.
- ELLIS, J.E., WINGFIELD, J.M., COLE, D., BOREHAM, P.F., LLOYD, D. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 23: 35-9, 1993.
- EMMERLICH, V., SCHOLZE, H., GILLIN, F.D., BAKKER-GRUNWALD, T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 87: 112-5, 2001.
- EMMERLICH, V., SANTARIUS, U., BAKKER-GRUNWALD, T., SCHOLZE, H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 131-4, 1999.
- ENEANYA, D.I., BIANCHINE, J.R., DURAN, D.O., ANDRESEN, B.D. The actions of metabolic fate of disulfiram. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 21: 575-96, 1981.
- ERTAN, P., YERELI, K., KURT, O., BALCIOĞLU, I.C., ONAĞ, A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. **Pediatr Int**, 44: 286-8, 2002.
- ESCOBEDO, A.A., CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother**, 8: 1885-902, 2007.
- FAIRLAMB, A.H. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. **Parasitology**, Suppl: 93-112, 1989.
- FARTHING MJ. Giardiasis. **Gastroenterol Clin North Am**, 25: 493-515, 1996.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev**, 13: 35-54, 2000.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J Parasitol**, 77: 441-8, 1991.
- FEELY, D.E., DYER, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. **J Protozool**, 34: 80-3, 1987.

FEITOSA, G., BANDEIRA, A.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R., BRITES, C. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, 5: 339-44, 2001.

FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev Assoc Med Bras**, 43: 61-8, 1997.

FINEGOLD, S.M. Metronidazole. **Ann Intern Med**, 93: 585-7, 1980.

FERNANDES, P.D., ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz J Med Biol Res**, 30: 93-9, 1997.

FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54: 679-708, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**, 15: 7761-4, 1989.

FULLER, R.K., GORDIS, E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? **Addiction**, 99: 21-4, 2004.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, 14: 114-28, 2001.

GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J., WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther**, 266: 23-32, 1993.

GASCÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, 73: 102-8, 2006.

GESSNER, T., JAKUBOWSKI, M. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester. A metabolite of disulfiram. **Biochem Pharmacol**, 15: 219-30, 1972.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., MCCAFFERY, J.M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679-705, 1996.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. **Infect Immun**, 56: 705-7, 1988.

GILLIS, J.C., WISEMAN, L.R. Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, 51: 621-38, 1996.

GIULIVI, C., TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 30: 243-51, 1988.

GU, F., CRUMP, C.M., THOMAS, G. Trans-Golgi network sorting. **Cell Mol Life Sci**, 58: 1067-84, 2001.

GUERRANT, R.L., KIRCHHOFF, L.V., SHIELDS, D.S., NATIONS, M.K., LESLIE, J., DE SOUSA, M.A., ARAUJO, J.G., CORREIA, L.L., SAUER, K.T., MCCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J Infect Dis**, 148: 986-97, 1983.

GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.T.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop**, 37: 501-06, 1995.

GUZIK, T.J., OLSZANECKI, R., SADOWSKI, J., KAPELAK, B., RUDZIŃSKI, P., JOPEK, A., KAWCZYŃSKA, A., RYSZAWA, N., LOSTER, J., JAWIEN, J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., CHANNON, K.M., KORBUT, R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. **J Physiol Pharmacol**, 56: 313-23, 2005.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*-current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res**, 88: 591, 2002.

HARRIS, J.C., PLUMMER, S., LLOYD, D. Antigiardial drugs. **Appl Microbiol Biotechnol**, 57: 614-9, 2001.

HALL, A.; NAHAR, Q. Albendazole as a treatment for infectious with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 87: 84-6, 1993.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.

HILL, B.G., HABERZETTL, P., AHMED, Y., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth muscle cell. **Biochem J**, 3, 2007.

HILL, D.R. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infect. Dis. Clin. N. A**, 7: 503-25, 1993.

HILL GASTON, J.S., LILICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 17: 219-39, 2003.

HU, P., JIN, L., BAILLIE, T.A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. **J Pharmacol Exp Ther**, 281: 611-7, 1997.

ISAAC-RENTON, J., MOOREHEAD, W., ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. **Appl. Environ. Microbiol**, 62: 47-54, 1996.

ISAAC-RENTON, J.L., CORDEIRO, C., SARAFIS, K., SHAHRIARI, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. **J Infect Dis**, 167: 431-40, 1993.

JARROLL, E.L., SENER, K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. **Drug Resist Updat**, 6: 239-46, 2003.

JIN, L., DAVIS, M.R., HU, P., BAILLIE, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. **Chem Res Toxicol**, 7: 526-33, 1994.

JOHANSSON, B., PETERSEN, E.N., ARNOLD, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethylthiocarbamic acid methyl ester. **Biochem Pharmacol**, 38: 1053-9, 1989.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404, 1982.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. **J Infect Dis**, 140: 984-8, 1979.

KATIYAR, S.K., GORDON, V.R., MCLAUGHLIN, G.L., EDLIND, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, 38: 2086-90, 1994.

KATTENBACH, W.M., PIMENTA, P.F., DE SOUZA, W., PINTO DA SILVA, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res**, 77: 651-8, 1991.

KAVOUSHI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, 28: 19-23, 1979.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 77: 487-88, 1983.

Krulewitch, C.J. An unexpected adverse drug effect. **J Midwifery Womens Health**, 48: 67-8, 2003.

KUŹMICKI, R., JESKE, J. Observations of the efficacy of ornidazole (Tiberall La Roche) in treatment of giardiasis. **Wiad Parazytol**, 40: 65-8, 1994.

LANFREDI-RANGEL, A., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 85: 951-5, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A., KATTENBACH, W.M., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 245-51, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH, W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol**, 123: 225-35, 1998.

LEITSCH, D., KOLARICH, D., WILSON, I.B., ALTMANN, F., DUCHÊNE, M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol**, 5: 211, 2007.

LEMÉE, V., ZAHARIA, I., NEVEZ, G., RABODONIRINA, M., BRASSEUR, P., BALLET, J.J., FAVENNEC, L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **J Antimicrob Chemother**, 46: 819-21, 2000.

LEVI, G.C., DE AVILA, C.A., NETO, V.A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 19: 422-4, 1977.

LI, L., WANG, C.C. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Mol Microbiol**, 59: 202-11, 2006.

LILL, R., KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, 25: 352-6, 2000.

LILL, J.S., MAYS, D.C., LIPSKY, J.J. S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. **Xenobiotica**, 26: 1025-33, 1996.

LINDMARK, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. **Exp Parasitol**, 65: 141-7, 1988.

LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 10: 476-82, 1976.

LINSTEAD, D.J., BRADLEY, S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 125-33, 1988.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., MITCHELL, A., HUGHES, M.N., WADLEY, R.B., EDWARDS, M.R. Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **J Appl Microbiol**, 5: 576-83, 2003.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., WADLEY, R., RALPHS, J.R., HANN, A.C., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. **Microbiology**, 148: 1349-54, 2002.

- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., BIAGINI, G.A., WADLEY, R.B., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, 146 12: 3109-18, 2000.
- LO, H., REEVES, R.E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 2: 23-30, 1980.
- LOEWENSON, R., MASON, P.R., PATTERSON, B.A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. **Ann Trop Paediatr**, 6: 73-8, 1986.
- LOO, T.W., CLARKE, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. **J Natl Cancer Inst**, 7: 898-902, 2000.
- LÓPEZ NIGRO, M.M., PALERMO, A.M., MUDRY, M.D., CARBALLO, M.A. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. **Toxicol In Vitro**, 17: 35-40, 2003.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61: 294-304, 1997.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., BYRD, L.G., NASH, T.E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 23: 7628-33, 1996.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem**, 8: 29307-13, 1995a.
- LUJÁN, H.D., MAROTTA, A., MOWATT, M.R., SCIAKY, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., NASH, T.E. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**, 3: 4612-8, 1995b.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., WU, J.J., LU, Y., LEES, A., CHANCE, M.R., NASH, T.E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. **J Biol Chem**, 9: 13807-13, 1995c.
- LUJÁN, H.D., NASH, T.E. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. **J Eukaryot Microbiol**, 41: 169-75, 1994.
- MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 161-4, 1998.

- MACHADO, R.C., MARCARI, E.L., DE FÁTIMA, S., CRISTANTE, V., CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíase em crianças de crèches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Brás. Méd. Trop**, 32: 697-704, 1999.
- MADAN, A., PARKINSON, A., FAIMAN, M.D. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. **Drug Metab Dispos**, 23:1153-62, 1995.
- MAJID, D.S., NISHIYAMA, A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. **Hypertension**, 39: 293-7, 2002.
- MALMSTRÖM, B.G. Enzymology of oxygen. **Annu Rev Biochem**, 51: 21-59, 1982.
- MEHLOTRA, R.K., TEKWANI, B.L. Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Microbes Infect**, 1: 385-94, 1999.
- MORGAN, U.M., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 328-31, 1993.
- MÜLLER, N., VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**, 35: 1339-47, 2005.
- MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem Pharmacol**, 1; 35: 37-41, 1986.
- MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, 93: 165-71, 1983.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I., QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, 35: 133-41, 2002.
- NASH, T.E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 45: 585-90, 2002.
- NASH, T., RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1488-92, 1998.
- NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop Med Int Health**, 6: 624-34, 2001.
- OBERHUBER, G., VOGELSANG, H., STOLTE, M., MUTHENTHALER, S., KUMMER, A.J., RADASZKIEWICZ, T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. **Am J Pathol**, 148: 1351-7, 1996.

OLNESS, K. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. **J Dev Behav Pediatr**, 24: 120-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Foodborne Diseases**, 2002. <disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em out, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The World Health Report**, Geneva, 1996

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R.P., DURLACHER, R., DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 621-5, 2001.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin Infect Dis**, 25: 545-9, 1997.

PAGET, T.A., RAYNOR, M.H., SHIPP, D.W., LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 63-7,

PAGET, T.A., JARROLL, E.L., MANNING, P., LINDMARK, D.G., LLOYD, D. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol**, 135: 145-54, 1989.

PILON-SMITS, E.A., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T., PILON, M. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. **Plant Physiol**, 130: 1309-18, 2002.

PIMENTEL, D., COOPERSTEIN, S., RANDELL, H., FILIBERTO, D., SORRENTINO, S., KAYE, B., NICKLIN, C., YAGI, J., BRIAN, J., O'HERN, J., HABAS A., WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, 35: 653-668, 2007.

PRITSOS, C.A., KEYES, S.R., SARTORELLI, A.C. Effect of the superoxide dismutase inhibitor, diethyldithiocarbamate, on the cytotoxicity of mitomycin antibiotics. **Cancer Biochem Biophys**, 10: 289-98, 1989.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, 90: 19-39, 2003.

RAIPULIS, J., TOMA, M.M., SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **Int J Food Microbiol**, 25: 343-7, 2005.

REIN, A., OTT, D.E., MIRRO, J., ARTHUR, L.O., RICE, W.G., HENDERSON, L.E. Suppression of retroviral replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. **Leukemia**, 11: 106-8, 1997.

REINER, D.S., MCCAFFERY, M., GILLIN, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol**, 53: 142-53, 1990.

RIVAS, L., MURZA, A., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Interaction of anti-malarial drug quinacrine with nucleic acids of variable sequence studied by spectroscopic methods. **J Biomol Struct Dyn**, 18: 371-83, 2000.

ROE, F.J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surgery**, 93: 158-64, 1983.

SAMARAWICKREMA, N.A., BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., THAMMAPALERD, N., UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother**, 40: 833-40, 1997.

SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 43: 1533-41, 1999.

SAUNA, Z.E., SHUKLA, S., AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol Biosyst**, 1: 127-34, 2005.

SAUNA, Z.E., NANDIGAMA, K., AMBUDKAR, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. **J Biol Chem**, 19: 48855-64, 2004.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, 22: 203-8, 2006.

SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, 4: 1749-60, 2007.

SCHMIDT, H.L., STÖCKLEIN, W., DANZER, J., KIRCH, P., LIMBACH, B. Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. **Eur J Biochem**, 1: 149-55, 1986.

SCULLY, B.E. Metronidazole. **Méd. Clin. North Am**, 72: 613-21, 1988.

SHINTANI, T., KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, 5: 990-5, 2004.

SLAVIN, I., SAURA, A., CARRANZA, P.G., TOUZ, M.C., NORES, M.J., LUJÁN, H.D. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 122: 95-8, 2002.

SMITH, N.C., BRYANT, C., BOREHAM, P.F. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 18: 991-7, 1988.

STANTON, T.B., JENSEN, N.S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **J Bacteriol**, 175: 2980-7, 1993.

STOCKIS, A., DE BRUYN, S., GENGLER, C., ROSILLON, D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 40: 221-7, 2002.

STROMME, J.H. Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. **Biochem Pharmacol**, 12: 705-15, 1963.

SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., DELGADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MÜLLER, M., TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13: 10368-73, 2004.

SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 22: 2156-61, 2007.

SVÄRD, S.G., MENG, T.C., HETSKO, M.L., MCCAFFERY, J.M., GILLIN, F.D. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 30: 979-89, 1998.

TACHEZY, J., SÁNCHEZ, L.B., MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol Biol Evol**, 18: 1919-28, 2001.

TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.

TÉLLEZ, A., PALM, D., WEILAND, M., ALEMÁN, J., WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E., SVÄRD, S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. **Parasite Immunol**, 27: 163-9, 2005.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**, 9: 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, 32: 493-6, 2002.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infections disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol**, 30: 1259-1267, 2000.

THOMPSON, S.C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J Paediatr Child Health**, 30: 202-9, 1994.

THOMPSON, R.C.A, REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, 32: 71-160, 1993.

TONKIN, E.G., VALENTINE, H.L., ZIMMERMAN, L.J., VALENTINE, W.M. Parenteral N,N-diethylthiocarbamate produces segmental demyelination in the rat that is not dependent on cysteine carbamylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1: 139-50, 2003.

TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, 56: 173-94, 1994.

UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, 14: 150-64, 2001a.

UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Ant. Ag. Chemoth**, 45: 1810-14, 2001b.

UPCROFT, P., EDWARDS, R.M., UPCROFT, J.A., BROWN, D.M. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

UPCROFT, J., UPCROFT, P. My favorite cell: *Giardia*. **Bioessays**, 20: 256-63, 1998.

UPCROFT, J.A., CAMPBELL, R.W., UPCROFT, P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. **Parasitology**, 112: 309-13, 1996.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol Today**, 9: 187-90, 1993.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., BOREHAM, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 20: 489-96, 1990.

VON ALLMEN, N., BIENZ, M., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Experimental infections of neonatal mice with cysts of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. **Infect Immun**, 72: 4763-71, 2004.

WASSMANN, C., HELLBERG, A., TANNICH, E., BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **J Biol Chem**, 10: 26051-6, 1999.

WEBSTER, B.H. Furazolidone in the treatment of giardiasis. **Am J Dig Dis**, 5: 618-22, 1960.

WEINBACH, E.C., CLAGGETT, C.E., KEISTER, D.B., DIAMOND, L.S., KON, H. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. **J Parasitol**, 66: 347-50, 1980.

WOLFE, M.S. Giardiasis. **N Engl J Med**, 9: 319-21, 1978.

VOOGD, C.E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, 86: 243-77, 1981.

WOO, P., PANAYI, G.S. Reactive arthritis due to infestation with *Giardia lamblia*. **J Rheumatol**, 11: 719, 1984.

WOOD, Z.A., SCHRODER, E. ROBIN HARRIS, J., POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, 28: 32-40, 2003.

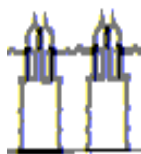
WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, 2: 529-41, 2003.

WRIGHT, C. 4TH., VAFIER, J.A., LAKE, C.R. Disulfiram-induced fulminating hepatitis: guidelines for liver-panel monitoring. **J Clin Psychiatry**, 49: 430-4, 1988.

XIE, Z., KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9: 1102-9, 2007.

YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 281: 30299-304, 2006.

ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop Med Int Health**, 2: 63-82, 1997.



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção
do grau de Mestre.

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Anjos, Karla Graziela Santana dos
A599e Efeitos do dietilditiocarbamato em trofozoítos de *giardia lamblia*: uma nova
ferramenta na terapia contra a giardíase [manuscrito] / Karla Graziela Santana dos. -
2008.
59 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório de Biomorfologia
Parasitária.

1. *Giardia Lamblia*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dietilditiocarbamato. T. I. Título.

CDU 616.995.132:615.32

AGRADECIMENTOS

Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Adriana Lanfredi Rangel

Primeiramente, pela amizade. Sua orientação na bancada foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho. Meu carinho por você é do tamanho do seu coração.

Msc. Cláudio Pereira Figueira

Pela amizade, incentivo e por muitas vezes me ajudar na hora do “sufoco”.

Glória Maria Maranhão Sweet

Por me acolher como uma mãe durante a realização deste trabalho. Sei que seremos eternas amigas!

Msc. Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Brandão

Pela amizade, companheirismo e apoio dado nos momentos difíceis.

Msc. Rafael Gomes, Diego Menezes e Alene Vanessa

Pelas discussões sobre estresse oxidativo e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Elizabeth Mota Costa

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

Elisângela Sodré

Pela amizade e excelente convivência.

Síntia Sacramento, Gustavo Miranda, Antônio Fávero e Edgard Neto

Aos giardólogos e amebólogos, pelo companheirismo e apoio durante todo este tempo na bancada.

Ana Lúcia Costa, Angélica Lacerda, Danielle Anjos, Daniel de Abreu Silva, Rafael Costa,

Thiara Monteiro, Samanta Alexandrino, Fernanda Bomfim e Lourdes Neta

Pela ótima convivência no laboratório.

Msc. Mateus Santos de Sá

Pelo apoio com o experimento de citotoxicidade em linfócitos.

Dr. Jorge Clarêncio

Pelo apoio dado na citometria de fluxo.

Taise Coutinho Caíres

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo suporte dado nas pesquisas.

Todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

Todos os professores e colegas do Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa de 2006

Pelos ensinamentos e amizade.

Todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Minha família (Carlos, Luiza e Vinícius) e meu noivo (Ricardo)

Por vocês existirem! Amo vocês, por inteiro!

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

Aquilo que todos os dias seria limite para nós é destinado a se tornar grande como o olhar de Nossa Senhora. Maria entendia que o conteúdo de cada condição humana desenvolve e realiza o desígnio de um Outro: não o desígnio do próprio coração, mas o do coração de Deus.

As dores, assim como a vida, certamente não lhes faltarão, mas vocês viverão a vida como um caminho; mesmo quando o caminho for fatigante, será a descoberta de um bem realmente grande.

Luigi Giussani

RESUMO

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, onde é exposto a diferentes concentrações de oxigênio. Apesar do metabolismo fermentativo, trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio e mecanismos de detoxificação são requeridos. Desprovido de glutatona, *Giardia* expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína (CRP, também conhecidas como proteínas variantes de superfície ou VSP), como defesa antioxidante. Este mecanismo envolve ciclagem redox para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido e proteção contra o estresse oxidativo. Neste contexto, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem compreender uma poderosa estratégia quimioterápica contra a giardíase. Neste estudo, nós analisamos os efeitos do dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor de superóxido dismutase (SOD), na proliferação do parasito, expressão de tióis totais, lipoperoxidação, produção de radicais livres e arquitetura celular. DETC inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao metronidazol e induziu a peroxidação de membranas neste parasito, possivelmente pelo aumento de espécies reativas. Alterações ultraestruturais também foram observadas neste protozoário. Células tratadas com DETC apresentaram alto grau de extração citoplasmática, além de estruturas indicativas de autofagia. As vesículas periféricas também se encontravam maiores, sugerindo confluência. Estes efeitos são independentes de SOD, já que *Giardia* não apresenta esta enzima. Detecção de grupos tiol com a sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA) foram significativamente moduladas negativamente pelo DETC. Estes dados nos indicam que DETC aumenta o estresse oxidativo em trofozoítos de *Giardia lamblia* pela reação com grupos tiol.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, dietilditiocarbamato, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The microaerophilic protozoan *Giardia lamblia* inhabits the upper small intestine mucosa of vertebrate hosts, where it is exposed to different concentrations of oxygen. Despite the fermentative metabolism, *Giardia* trophozoites consume O₂ and produce oxygen free radicals and therefore mechanism for detoxification are required. Devoid of glutathione, *Giardia* express high concentrations of cystein-rich proteins (CRP, also known as variable surface protein or VSP), as an antioxidant defense. This mechanism involves redox cycling for maintenance of a reduced intracellular environment and protection from oxidative stress. In this regard, substances that interfere in the antioxidant response of this protozoan could comprise a powerful chemotherapeutic strategy for *Giardia lamblia* infection. Here, we analyzed the effects of DETC, a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, on parasite proliferation, thiol expression, lipid peroxidation, free radicals detection and cell architecture. DETC inhibited parasite proliferation at levels similar to metronidazole and induced peroxidation of membrane, possibly by the increase of reactive species. Ultrastructural alteration were also observed. Since this protozoan is devoid of SOD, here present data indicate SOD-independ DETC effects. Thiol groups detection with the fluorescent probe *o*-phthaldialdehyde (OPA). Cells treated with DETC displayed washed out cytoplasm and structures indicative of autophagy. The peripheral vesicles also had an increased volume, presumably caused by homophilic fusion. Taken together these data indicate that DETC enhance the oxidative stress in *Giardia* trophozoites by reacting with thiol groups.

Keywords: Giardia lamblia, diethyldithiocarbamate, oxidative stress.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	05
Figura 2	Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	06
Figura 3	Trofozoíto de <i>Giardia</i> em seção transversal.....	09
Figura 4	Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.....	24
Figura 5	Avaliação do possível sinérgico do DETC e metronidazol em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	25
Figura 6	Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.....	27
Figura 7	Análise da expressão de tióis livres em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8	Quantificação dos grupos sulfidríla em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Figura 9	Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia</i> em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 10	Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	32
Figura 11	Microscopia de fluorescência (A, C, E) e contraste de fase (B, D, F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 12	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	36
Figura 13	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> tratados com DETC.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Ceará
CO ₂	Dióxido de carbono
CRPs	Proteínas ricas em cisteína
Cu	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT-diaforase	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
DTNB	5,5'- ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico)
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ DCFDA	5'- (6')- carboxi, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulina A
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Me	Grupamento metil
Mtz	Metronidazol
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
S	Enxofre

SH	Grupo sulfidrina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido dismutase
SP	São Paulo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VSPs	Proteínas variantes de superfície
<i>Zn</i>	<i>Zinco</i>

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A giardíase.....	01
1.2. A giardíase no Brasil.....	02
1.3. Ciclo biológico.....	03
1.4. O trofozoíto.....	07
1.5. Mecanismos de detoxificação de espécies reativas em <i>Giardia</i>	10
1.6. Tratamento da giardíase.....	11
1.6.1. Nitroimidazóis.....	11
1.6.2. Quinacrina.....	13
1.6.3. Furazolidona.....	14
1.6.4. Benzimidazóis.....	14
1.6.5. Paromicina.....	15
1.6.6. Nitazoxanida.....	15
1.6.7. Bacitracina complexada a sais de zinco.....	16
1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas.....	16
1.7. Dissulfiram: novos potenciais terapêuticos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19

3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	20
4.3. Ensaio de inibição.....	20
4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	20
4.5. Detecção de tióis totais.....	21
4.6. Lipoperoxidação.....	21
4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas.....	21
4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol.....	22
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	22
4.10. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	23
5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	25
5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i>	26
5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	28
5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC.....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GIARDÍASE

A Giardíase é uma enteroparasitose causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Espécies deste gênero infestam mais de 40 espécies de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2002; Appelbee *et al.*, 2005), que podem agir como reservatório para cepas patogênicas em humanos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma cística infectante que pode sobreviver no ambiente por meses e a trofozoíta, que prolifera intensamente na porção anterior do intestino (Adam, 2001). As manifestações clínicas da doença são diarreia aguda ou crônica (eventualmente esteatorréia), desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller & Von Allmen, 2005; Gascón, 2006). Artrite reativa também tem sido associada com infestações entéricas por *Giardia lamblia* (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), bem como o status nutricional afetando função cognitiva e desenvolvimento escolar em crianças pela prevalência de doenças infecciosas intestinais (Olness, 2003).

A distribuição da giardíase é mundial, sendo a parasitose intestinal mais comum em países desenvolvidos, com taxas de detecção entre 2-5% e, 20-30% em nações em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 1996 que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tinham sintomas de giardíase com cerca de 500.000 novos casos por ano, especialmente entre crianças. Em 2004, a giardíase foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido a sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarreicas (OMS, 2002).

Atualmente as infecções por *G. lamblia* são controladas por drogas, sendo as mais efetivas as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 1998). Casos de resistência clínica são relatados na literatura (Townson, 1994; Farthing, 1996), com taxas de recorrência acima de 90% (Zaat *et al.*, 1997). Além disso, o metronidazol exibe potencial carcinogênico para humanos (Bendesky *et al.*,

2002). Desta forma, a identificação de novas vias parasito-específicas e desenvolvimento de novas drogas é necessário para o tratamento da giardíase.

No lúmen intestinal do hospedeiro vertebrado, *Giardia* é exposta a diferentes concentrações de oxigênio (Biagini *et al.*, 2001). Apesar do metabolismo fermentativo, *Giardia* consome O₂, produzindo radicais livres de oxigênio e a resposta imune também pode usar espécies oxidativas (Fernandes & Assreuy, 1997). Desta forma, mecanismos de detoxificação são requeridos (Brown *et al.*, 1995). Trofozoítos de *Giardia* são cobertos por proteínas ricas em cisteína (CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície), envolvidas na proteção do parasito contra os efeitos letais do oxigênio (Mehlotra & Tekwani, 1999). Além disso, estas proteínas estão associadas à resistência a proteases e à variação antigênica, sendo identificados cerca de 150 genes diferentes que codificam para as CRPs em *G. lamblia* (Nash, 2002). A enzima dissulfeto redutase está presente em *Giardia*, conferindo um balanço redox dissulfeto intracelular, ressaltando a importância da cisteína neste parasito na resposta ao estresse oxidativo. A cisteína é descrita como um fator de crescimento essencial para a *Giardia*, o que pode ser verificado no cultivo axênico (Luján & Nash, 1994; Mehlotra & Tekwani, 1999). Nesse sentido, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem constituir uma poderosa estratégia quimioterápica no parasitismo por *Giardia lamblia*.

1.2. A GIARDÍASE NO BRASIL

No Brasil, sua ocorrência é em grande parte desconhecida - principalmente em adultos. Prevalências relatadas de giardíase em crianças brasileiras variam de 14,6% em populações específicas a 78,3% em creches e crianças em idade escolar (Machado & Costa-Cruz, 1998; da Costa-Macedo *et al.*, 1998; Orlandi *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo sobre a giardíase foi realizado em Gonçalves Dias no município de Fortaleza (CE), acompanhando crianças recém-nascidas até os 4 anos de idade (Newman *et al.*, 2001). Dentre as 157 crianças, 43 (27,4%) encontravam-se infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 46% apresentaram recorrências ou recidivas. As crianças que apresentavam sintomas tiveram valores reduzidos de peso e altura, quando avaliados física e nutricionalmente.

No Hospital da Universidade Federal da Bahia, foi realizado um estudo detalhado sobre a prevalência de parasitos intestinais em 365 pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Cerca de 4,9% destes pacientes apresentaram infestação por *Giardia lamblia*, demonstrando uma prevalência significativamente aumentada quando comparada ao grupo que não apresentava a SIDA (2,4%). O grupo controle foi composto por 5243 pacientes (Feitosa *et al.*, 2001).

Machado *et al.* (1999), em um estudo sobre a incidência de giardíase em crianças de creches e escolas de ensino fundamental e médio, no município de Mirassol (SP), confirmam os dados obtidos por outros autores (Wolfe, 1978; Cardoso *et al.*, 1995; Guimarães & Sogayar, 1995) que tanto a idade (2 a 6 anos) quanto o nível sócio-econômico (até 6 salários mínimos) são fatores de risco determinantes da giardíase. Isto se dá pelo fato do nível sócio-econômico e grau de escolaridade mais baixos influenciarem as condições de higiene pessoal e cuidados com alimentos e água (Machado *et al.*, 1999). Um estudo prospectivo de doenças diarréicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para aquisição de giardíase (Guerrant *et al.*, 1983).

Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) demonstraram haver associação entre má nutrição (desnutrição energético-protéica) e o parasitismo por *Giardia lamblia* através da observação de redução significativa dos valores de peso em relação à idade e altura. Outros estudos demonstraram a relação entre infestações por *Giardia* e subnutrição na África (Loewenson *et al.*, 1986) e Ásia (Al-mekhlafi *et al.*, 2005). Ertan *et al.* (2002) também encontraram associação entre baixos níveis séricos de ferro e zinco e a giardíase.

O decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasito (Wolfe, 1978; Hill, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1999) e também com a melhoria dos hábitos de higiene pessoal associada ao aumento da idade.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

A infestação por *Giardia* ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados por fezes contendo cistos (Fig. 1), como ocorre freqüentemente em creches e

orfanatos onde as condições de higiene podem estar comprometidas (Thompson, 2004). O encistamento ocorre no trato digestório, auxiliado pelo baixo pH e proteases estomacais (Adam, 2001), dando origem ao excizoíto (Bernander *et al.*, 2001). O excizoíto é oval, possui oito flagelos, quatro núcleos e metabolismo intermediário entre o trofozoíto e o cisto (Fig. 2). Possui uma ploidia total de 16N, sofrendo divisão celular por duas vezes sem replicação do DNA, gerando quatro trofozoítos com uma ploidia de 4N (Bernander *et al.*, 2001). Estes últimos irão se dividir por fissão binária e a adesão ao epitélio intestinal se dá através do disco ventral (Elmendorf *et al.*, 2003).

O encistamento ocorre com a passagem dos trofozoítos pelo lúmen intestinal, onde eles se soltam e são expostos na região posterior do intestino a um pH mais alcalino (em torno de 7,8), ácidos graxos e sais biliares (Gillin *et al.*, 1988). A ausência de lipoproteínas também demonstrou ser um fator de promoção do encistamento, o que pôde ser revertido pela adição de colesterol (Luján *et al.*, 1996).

O processo de formação da parede cística envolve a ativação dos genes de encistamento em resposta a estímulos e posterior síntese de proteínas que constituirão a parede cística (Lujan *et al.*, 1995a; 1997), as quais são transportadas para a membrana plasmática através das vesículas específicas de encistamento (ESVs) (Reiner *et al.*, 1990; Benchimol, 2004). Durante o tráfego destas proteínas, é provável que haja a participação das vesículas periféricas na maturação do material a ser secretado (Touz *et al.*, 2002a).

O potencial zoonótico desta doença tem sido considerado na literatura como um fator de relevância na transmissão peridomiciliar de felídeos e canídeos (Thompson, 2000).

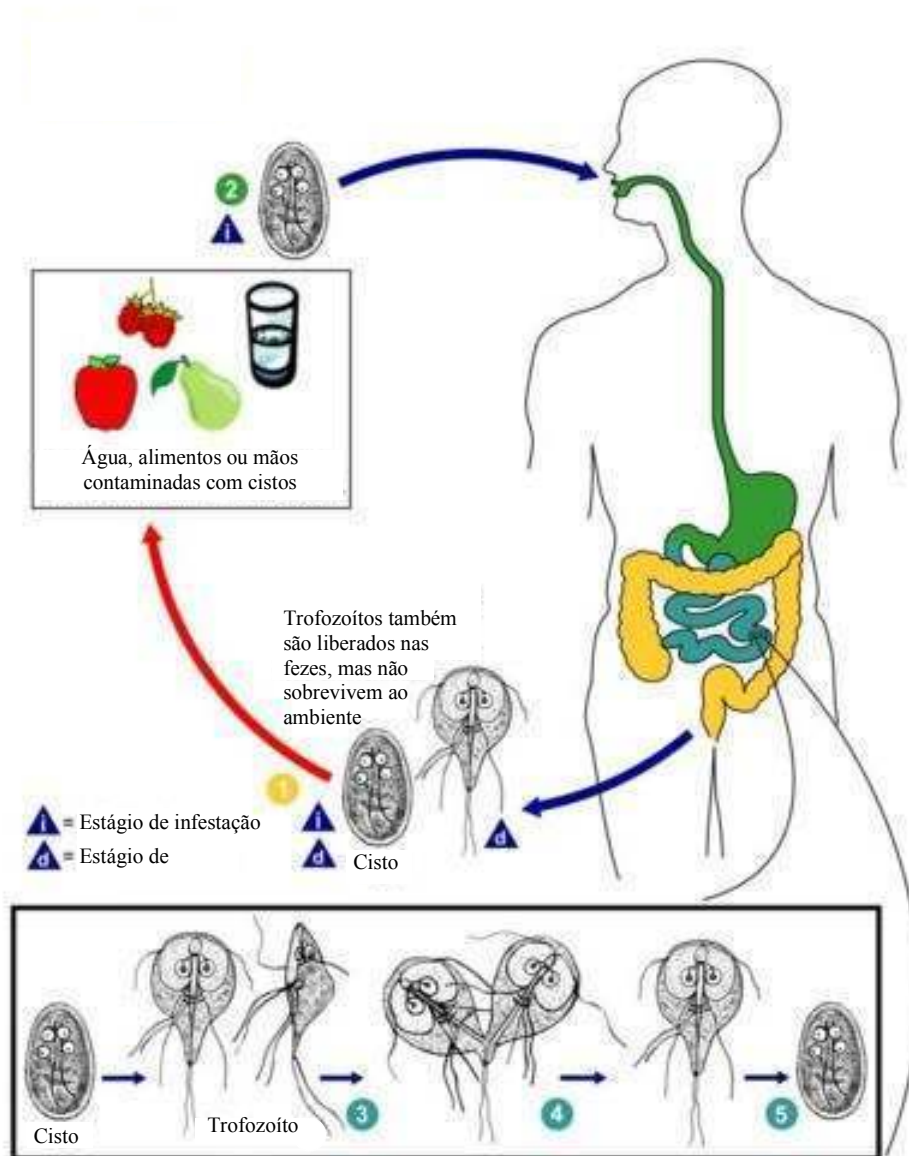


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Cistos e trofozoítos eliminados através das fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Trofozoítos em processo de divisão. (5) Encistamento. Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc-gif>.

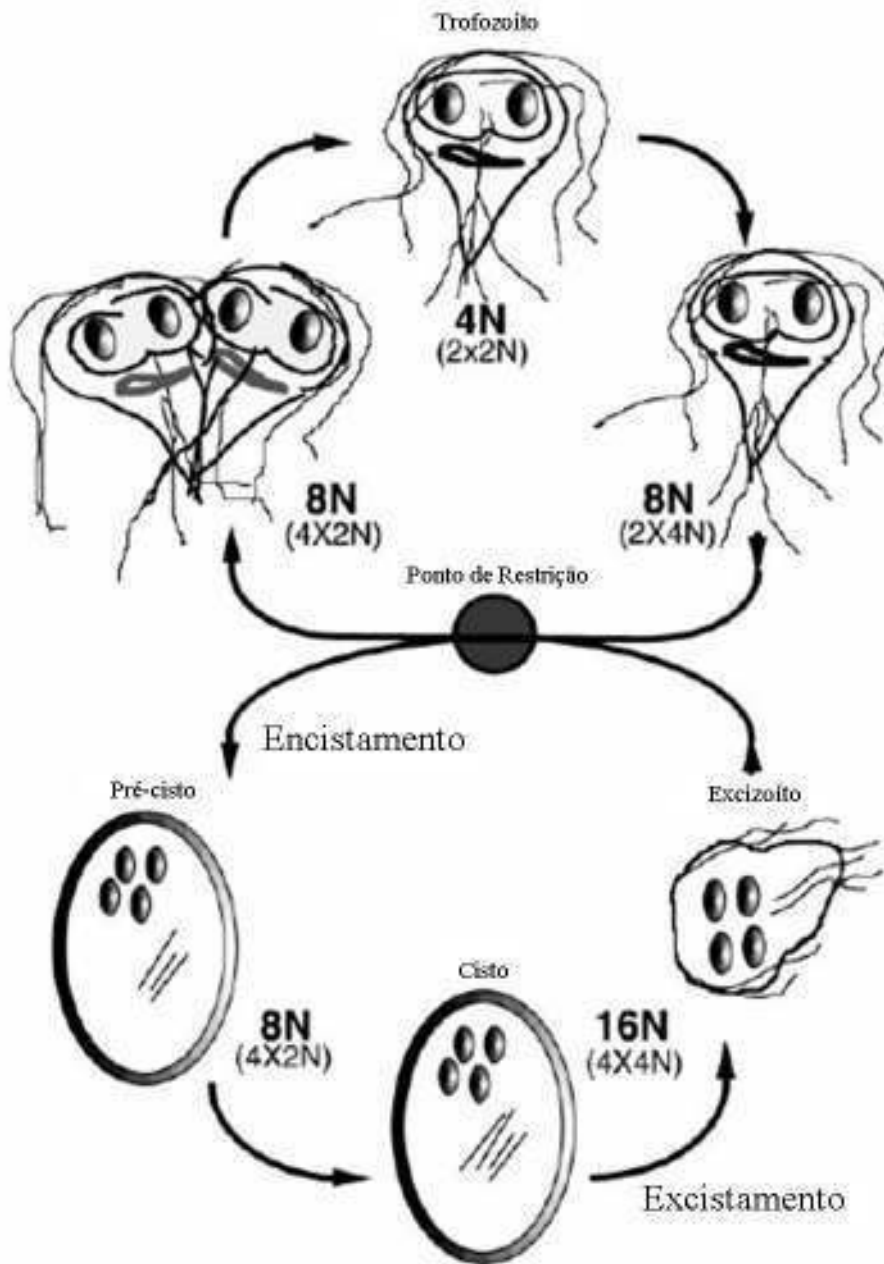


Figura 2. Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Durante o crescimento vegetativo, a ploidia varia entre $4N$ e $8N$. Após a estimulação do encistamento e concomitante formação da parede cística, o núcleo se divide, resultando em uma célula tetranucleada com ploidia de $8N$. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros, com uma ploidia celular de $16N$. O excistamento resulta na liberação de um excizoíto, que se divide duas vezes para formar quatro trofozoítos, contendo cada um dois núcleos diplóides. Adaptado de Bernander *et al.*, 2001.

1.4. O TROFOZOÍTO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* são piriformes, possuindo cerca de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, látero-posterior, caudal e ventral), sendo que os axonemas caudais são acompanhados pelo corpo funis e um disco adesivo é responsável pela adesão do trofozoíto às microvilosidades intestinais (Fig.3). Possui dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente e simétricos ao eixo longitudinal (Revisto por Adam, 2001). Ribossomos e grânulos de glicogênio se apresentam por todo o citoplasma e o retículo endoplasmático se projeta da região perinuclear até a região das vesículas periféricas, na região dorsal da célula (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). O complexo de Golgi torna-se visível em trofozoítos em processo de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999), mas não tem sido confirmada a presença em trofozoítos vegetativos (Gillin *et al.*, 1996). Apesar disso, mecanismos de transporte de proteínas estão presentes em *Giardia*, semelhantes aos que ocorrem na rede *trans* do aparelho de Golgi na maioria das células complexas (Gu *et al.*, 2001). Algumas evidências sugerem que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar organela(s) com função típica de Golgi, apesar de não ter sua aparência. NBD-ceramida, um marcador do complexo de Golgi em células de mamíferos, marcou uma estrutura perinuclear tanto em trofozoítos vegetativos, quanto em células em processo de encistamento (Luján *et al.*, 1995b; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

As vesículas periféricas são caracterizadas pela acidez dos seus compartimentos, como demonstrado através da incorporação de laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), bem como pela concentração de ferritina exógena e lucifer yellow, sugerindo seu papel na endocitose (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Os vacúolos contêm uma variedade de enzimas com atividade hidrolásica, como por exemplo, a fosfatase ácida, proteases e RNase, indicando suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). É provável que ocorra maturação destes vacúolos de endossoma inicial, tardio até lisossomo, processo que pode estar funcionalmente associado ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Apesar de *Giardia* não possuir mitocôndria, a presença de membranas especializadas com função transportadora de elétrons tem sido detectada (Lloyd *et al.*, 2002). Conhecidas como mitossomos, estas organelas são responsáveis pela produção de H₂ e apresentam maquinaria protéica para biossíntese de centros Fe-S (Tachezy *et al.*, 2001). Em eucariotos, este processo

ocorre exclusivamente em organelas limitadas por dupla membrana, como mitocôndria (Lill & Kispal, 2000), hidrogenossomos (Sutak *et al.*, 2004) e cloroplastos (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Peroxissomos, que são organelas citoplasmáticas responsáveis por reações oxidativas, estão ausentes neste parasito.

Os proteassomos de *Giardia* apresentam muitas similaridades com os de Archaea (Emmerlich *et al.*, 1999). Além disso, proteínas alvo de proteassomos são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar presente neste protozoário como um gene de cópia única, o que o distingue dos outros eucariotos, que possuem múltiplas cópias desse gene (Emmerlich *et al.*, 2001).

Cerca de 30% dos trofozoítos apresentam uma protrusão ventral que emerge da região central do disco adesivo. A observação desta estrutura revelou a presença de cisternas de retículo endoplasmático, muitas vezes formando membranas concêntricas envolvendo quantidades variadas de grânulos de glicogênio, possivelmente em processo de degradação, além de vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

A flange ventrolateral é uma projeção citoplasmática maleável, semelhante a lamelipódios, localizada entre as regiões de superfície ventral e dorsal e que se ajusta as microvilosidades das células epiteliais durante a adesão (revisto por Adam, 2001).

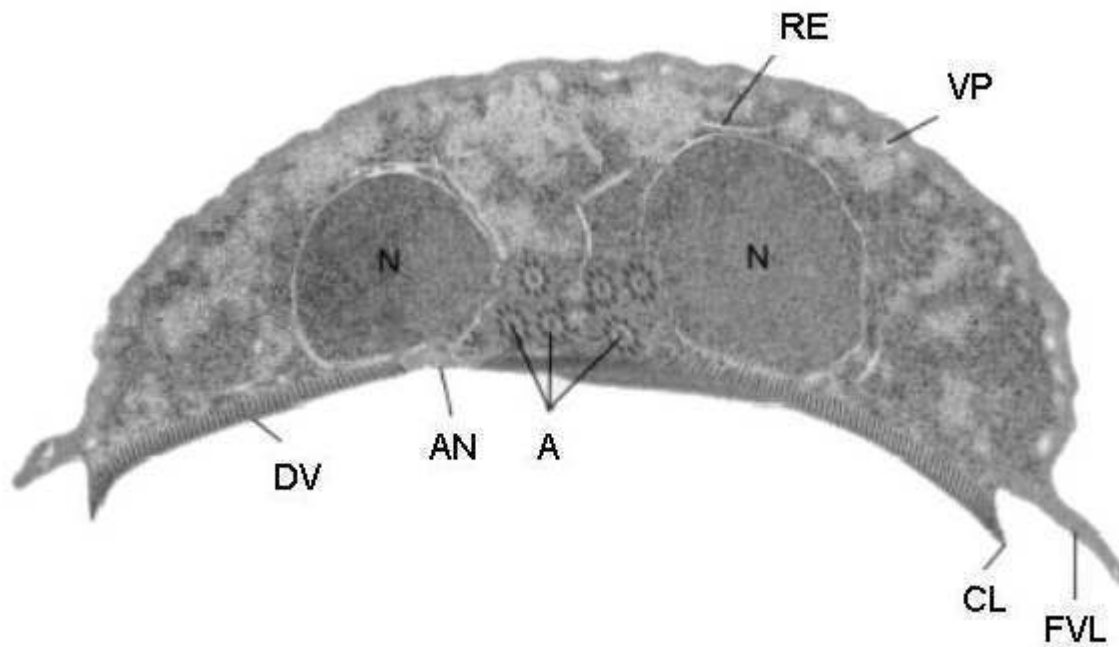


Figura 3. Trofozoíto de *Giardia* em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Adaptado de Adam, 2001.

1.5. MECANISMOS DE DETOXIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM *Giardia*

Apesar de não possuir mitocôndria, *Giardia* consome oxigênio e os produtos finais do seu metabolismo de glicose são sensíveis às tensões de O₂ presentes no lúmen intestinal. Em um ambiente anaeróbico, etanol, alanina e dióxido de carbono (CO₂) são formados em concentrações equimolares. Contudo, quando o oxigênio é introduzido, o balanço de carbono é radicalmente alterado. A produção de alanina é reduzida em cerca de 90% e a produção de acetato é simultaneamente aumentada em cerca de dez vezes. A concentração de CO₂ é aproximadamente duas vezes aumentada, mas a produção de etanol não é alterada (Paget *et al.*, 1990). A capacidade de respirar de alguns protozoários anaeróbicos sugere que eles são capazes de transferir elétrons ao oxigênio como seu aceptor final. Contudo, seu metabolismo permanece fermentativo, mesmo em condições aeróbicas. A utilização de O₂ por *Giardia lamblia* não é afetada por inibidores de respiração mitocondrial, mas bloqueada por flavo-antagonistas, inibidores de tiol e quelantes de metal (Weinbach *et al.*, 1980), sugerindo que algumas das flavoproteínas, tioproteínas e metaloproteínas podem usar O₂ como aceptor de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio neste parasito.

Os mecanismos de detoxificação de espécies oxidativas neste parasito incluem a atividade citoplasmática de uma oxidase flavina-dependente (NADH oxidase), que reduz tetravalentemente O₂ em H₂O, além de estar envolvida em mecanismos de resistência ao metronidazol de algumas cepas, que expressam altos níveis de atividade desta enzima (Ellis *et al.*, 1993). A susceptibilidade de *Giardia lamblia* ao oxigênio também é justificada pela presença da DT-diaforase, uma enzima que tem sua atividade acompanhada pelo aumento intracelular de peróxido de hidrogênio (Li & Wang, 2006). A NADH peroxidase, localizada na região transmembrana de *Giardia lamblia*, catalisa a formação de água a partir de peróxidos (Brown *et al.*, 1995).

Um importante mecanismo de proteção contra o ambiente hostil ao qual *Giardia* é submetido no intestino está relacionado a um ambiente redutor produzido pelas CRPs, que apresentam de 11 a 12% de cisteína e são expressas em *Giardia lamblia* em concentrações milimolares (Luján & Nash, 1994). A cisteína é o principal tiol de baixo peso molecular neste parasito, mas baixos níveis de sulfito, ácido tioglicólico e coenzima A também foram observados, enquanto que glutatona e seus intermediários não foram detectados (Brown *et al.*, 1993). Além disso, subsequente identificação de uma dissulfeto redutase (semelhante à tioredoxina redutase),

que utiliza cistina como aceptor primário de elétrons em *Giardia*, parece ser o maior sistema de atividade redox tiol-dissulfeto contra o estresse oxidativo neste protozoário (Brown *et al.*, 1996b). Pesquisas em dados de base genômicas em *G. lamblia* revelaram também homólogos de tioredoxinas peroxidases que, se expressadas, podem proteger organismos dos radicais livres de oxigênio pela redução de peróxidos com os elétrons da tioredoxina (Wood *et al.*, 2003).

Algumas das enzimas reconhecidamente envolvidas na detoxificação de radicais livres de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água pela catalase, não estão presentes em *Giardia*, sugerindo a importância dos grupamentos tiol na sobrevivência deste parasito (Brown *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Biagini e colaboradores (2001) descreveram o potencial antioxidante do piruvato em *Giardia*, transformando não enzimaticamente superóxido e peróxido de hidrogênio em acetato e CO₂.

Uma importante estratégia do parasito *G. lamblia* contra a defesa do hospedeiro durante a colonização da mucosa intestinal se dá através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase epitelial, por uma competição pela arginina, utilizada como fonte de energia pelo parasito. O NO apresenta propriedades citostáticas contra *Giardia* e o bloqueio de sua produção, conseqüentemente, permitirá a sua proliferação (Eckmann *et al.*, 2000).

Morte de trofozoítos de *Giardia lamblia* por macrófagos murinos ativados ocorreu rapidamente *in vitro* (Fernandes & Asseruy, 1997), com 60% dos parasitos sendo eliminados em cerca de 2 horas. Um inibidor de NO sintase, *N*-iminoetil-1-ornitina, protegeu os organismos. A extrema sensibilidade deste parasito ao estresse nitrosativo é principalmente devida à interrupção de funções da membrana plasmática, e perda da capacidade do consumo de O₂ em associação com a diminuição da atividade flagelar (Lloyd *et al.*, 2003).

1.6. TRATAMENTO DA GIARDÍASE

1.6.1. Nitroimidazóis

Os agentes da classe dos nitroimidazóis utilizados para tratamento de infecções por *Giardia* incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. O metronidazol foi primeiramente relatado para o tratamento da tricomoníase (Durel *et al.*, 1960), sendo posteriormente indicado para uso terapêutico na giardíase (Darbon *et al.*, 1962). Desde então, a síntese e testes biológicos de outros compostos nitroimidazóis têm sido uma crescente, aumentando o arsenal terapêutico contra protozoários e bactérias anaeróbicas (Scully, 1988; Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 2001a; Harder, 2002). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (Raether & Hänel, 2003).

Dos nitroimidazóis, o mecanismo de ação do metronidazol tem sido o mais amplamente estudado. A ativação da droga se dá através da redução do seu grupo nitro pela piruvato: ferredoxina oxidoredutase (Townson *et al.*, 1994; Samuelson, 1999), e um gradiente favorecendo o transporte intracelular do metronidazol é estabelecido por esta reação de redução. A atividade antimicrobiana deste composto reduzido resulta da reatividade e dismutação de intermediários instáveis, que matam os trofozoítos através da interação com várias moléculas essenciais como o RNA, DNA, proteínas e componentes de membrana, resultando em danos celulares irreversíveis (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988; Freeman *et al.*, 1997). Além destes efeitos, o metronidazol inibe o consumo de O₂ do trofozoíto, por agir como um aceptor de elétrons alternativo (Paget *et al.*, 1989). Apesar de este composto ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, ele se mostra ineficaz contra os cistos, provavelmente pela dificuldade em ultrapassar a barreira imposta pela parede cística (Thompson *et al.*, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do metronidazol incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (Levi *et al.*, 1977; Kavousi, 1979). Além disso, a inibição da aldeído desidrogenase por esta droga pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), pela ingestão de álcool durante o período de tratamento (Gardner & Hill, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos em altas doses por longos períodos tem sido relatado na literatura (Lindmark & Muller, 1976; Voogd, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (Bendesky *et al.*, 2002). O uso prolongado deste fármaco, falhas no tratamento e má conduta terapêutica tem aumentado os níveis de resistência clínica em pacientes parasitados por *Giardia lamblia*. Na França, mais de

20% dos casos de giardíase apresentam algum grau de resistência à droga (Lemeé *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001b).

Evidências clínicas em adultos e pacientes pediátricos têm demonstrado a eficácia e segurança do tinidazol no tratamento contra a giardíase, podendo ser usado em casos onde houve falhas no tratamento com o metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007). Apesar dos efeitos adversos relatados pelo uso deste fármaco, a exemplo de gosto amargo na boca, vertigem e perturbações intestinais, estes não são tão comuns como os causados pela utilização do metronidazol (Jokipii & Jokipii, 1979; 1982).

Um outro derivado dos 5-nitroimidazóis que é uma boa alternativa para o tratamento da giardíase é o ornidazol. Apesar dos poucos estudos realizados, este fármaco apresenta uma excelente eficácia, comparável ao tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1982; Bassily *et al.*, 1987; Kuzmicki & Jeske, 1994). Em um estudo *in vitro*, efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pelo ornidazol em culturas de sangue periférico humano foram sugeridos (López *et al.*, 2003). Apesar disso, efeitos colaterais raramente ocorrem em pacientes que fazem uso deste fármaco via oral (Escobedo & Cimerman, 2007).

O secnidazol também apresenta uma boa eficácia contra a giardíase, sendo rápida e completamente absorvido por via oral. Assim como o tinidazol e o ornidazol, este composto apresenta uma meia-vida longa (17-29 horas), o que permite a administração em dose única com concomitante diminuição dos efeitos colaterais em relação ao metronidazol (Gillis & Wiseman, 1996). Efeitos adversos têm sido relatados, a maioria notavelmente relacionada a distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.2. Quinacrina

A quinacrina é um derivado de acridina que foi primeiro introduzido como agente antimalárico em 1930. Somente em 1937 a eficácia deste composto foi demonstrada contra *Giardia*. Por muitos anos a quinacrina foi a droga de escolha no tratamento da giardíase, sendo substituída na década de 60 pelo metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação deste fármaco no parasito não está completamente elucidado. A diminuição do consumo de oxigênio pela interferência com componentes flavina de enzimas

como a NADH oxidase (Paget *et al.*, 1989) e inibição da síntese de ácidos nucléicos pela ligação ao DNA (Rivas *et al.*, 2000) são proposições feitas para o modo de ação desta droga. Após administração oral, a quinacrina é totalmente absorvida pelo trato intestinal, mesmo em pacientes com diarreia severa. Sua meia-vida é longa, sendo vagarosamente excretado pelos tecidos.

A toxicidade seletiva da quinacrina se deve ao fato de que a taxa de incorporação da droga no parasito é maior do que nas células do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). Este fármaco é eficaz contra cistos e também promove a redução do excistamento *in vitro*. Resistência induzida em culturas por quinacrina tem sido demonstrada, estando relacionada a uma diminuição da taxa de incorporação desta droga pelo protozoário (Upcroft *et al.*, 1996).

Efeitos colaterais deste fármaco incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, gosto amargo na boca e coloração amarelada ou alaranjada na pele e urina (Harris *et al.*, 2001). Outros efeitos relatados são hemólise em pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, psicose tóxica e exacerbação da psoríase (Gardner & Hill, 2001).

1.6.3. Furazolidona

Este derivado de nitrofurano foi descoberto em 1940, mas só em 1960 foi relatada sua atividade contra *Giardia lamblia* (Webster, 1960). Sua eficácia é menor do que a do metronidazol e quinacrina, porém sua grande vantagem consiste em sua formulação líquida, o que facilita a administração desta droga, principalmente em crianças (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação da furazolidona consiste na redução do seu grupo nitro pela NADH oxidase, cujos radicais citotóxicos causam danos aos componentes celulares, incluindo o DNA (Brown *et al.*, 1996a). Resistência está relacionada à diminuição das taxas de incorporação da droga pelo parasito e aumento dos níveis de enzimas com ciclagem tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. Podem também ocorrer reações semelhantes às causadas pelo dissulfiram após ingestão de álcool (Gardner & Hill, 2001). Efeitos mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura decorrentes do uso da furazolidona (Raipulis *et al.*, 2005).

1.6.4 Benzimidazóis

Inicialmente reconhecidos como drogas antihelmínticas, os benzimidazóis possuem um amplo espectro de ação, inclusive contra alguns protozoários (Escobedo & Cimerman, 2007). Dois membros dessa classe são utilizados no tratamento da giardíase, o albendazol e o mebendazol. Eles exercem seus efeitos pela ligação à β -tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e falhas na incorporação de glicose também ocorrem (Gardner & Hill, 2001). Cacopardo *et al.* (1995) demonstraram que a combinação albendazol-metronidazol foi 100% eficaz em portadores de *G. lamblia* resistente ao metronidazol. Uma outra vantagem relacionada ao uso do albendazol é a relativa falta de efeitos colaterais. A OMS recomenda que mulheres em período gestacional só recebam tratamento com albendazol e mebendazol a partir do terceiro mês de gestação (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.5. Paromicina

A paromicina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem sido uma alternativa eficaz e menos tóxica para gestantes infectadas por *Giardia* e em caso de cepas resistentes (Hill, 1993). O mecanismo de ação proposto para este fármaco é através da inibição da síntese protéica, interferindo nas subunidades ribossomais do parasito, que possuem tamanhos e seqüências incomuns (Katiyar *et al.*, 1994).

Após administração oral, pouco da droga é absorvida pela circulação sistêmica, atingindo altas concentrações no intestino. A maior parte da paromicina é excretada nas fezes. Em pessoas com disfunção nos rins, este fármaco pode se acumular e causar toxicidade renal (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.6. Nitazoxanida

A nitazoxanida é um 5-nitrotiazol que possui amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias, protozoários e helmintos. Estudos clínicos e *in vitro* têm confirmado a eficácia da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, no tratamento da giardíase. O mecanismo de ação é semelhante à classe dos 5-nitroimidazóis, através do grupo nitro (Adagu *et al.*, 2002). A absorção e bioviabilidade desta droga são aumentadas pela administração conjunta com alimentos (Stockis *et al.*, 2002). Uma vez fracamente absorvido pelo trato gastrointestinal, dois terços deste fármaco são expelidos pelas fezes e um terço pela urina (Broekhuysen *et al.*, 2000). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais.

1.6.7 Bacitracina complexada a sais de zinco

Este fármaco é composto de dois agentes: a bacitracina, um antibiótico produzido pela cepa Tracy-1 de *Bacillus subtilis*, e zinco, que promove estabilidade a este composto. Efeitos colaterais da bacitracina complexada a sais de zinco foram notados somente em um pequeno número de pacientes e incluem diarreia, náusea e desconforto abdominal. O uso prolongado desta droga causa problemas nefrotóxicos e distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas

O emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inapropriadas, os baixos custos e a facilidade de obtenção de determinados fármacos têm ocasionado resistência e feito com que em muitas partes do mundo, drogas como a cloroquina, penicilina e a meticilina sejam novamente utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Upcroft & Upcroft, 2001a).

Uma recente revisão do grupo dos Upcroft aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento não apenas da giardíase, como também para a amebíase e outras protozooses (Wright *et al.*, 2003).

A busca de novos fármacos para uso no combate a parasitoses intestinais vem sendo considerável. No que concerne a giardíase, diferentes drogas têm sido utilizadas, mas nenhuma é plenamente satisfatória, principalmente pela alta incidência de efeitos colaterais que justificam as contra-indicações e ocorrência significativa de falhas no tratamento. Nesse sentido, é de fundamental importância a realização de novas pesquisas em estratégias terapêuticas para a giardíase, tornando-se uma área de desenvolvimento em potencial nos próximos anos (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.7. DISSULFIRAM: NOVOS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

O dissulfiram, ou tetraetiltiuram dissulfeto, tem sido usado por mais de meio século para terapia de aversão ao álcool, através da inibição da enzima hepática aldeído desidrogenase (ALDH) (Sauna *et al.*, 2005). Sua farmacocinética tem sido extensivamente estudada, sendo considerada pela FDA e OMS uma droga segura e eficaz. Nesta última década numerosos relatos vêm sugerindo a utilização deste fármaco no tratamento do câncer e infecções fúngicas (Sauna *et al.*, 2005). A reversão do fenótipo MDR (Resistência a Múltiplas Drogas) pela inibição dos transportadores ABC, através de sua ligação com um de seus membros, a P-glicoproteína (Pgp) (Loo & Clarke, 2000; Sauna *et al.*, 2004), e seus poucos efeitos colaterais, mesmo em uso prolongado (Brewer, 1984; Chick, 1999; Brar *et al.*, 2004) fazem do dissulfiram uma droga com múltiplos alvos terapêuticos em potencial.

Recentes estudos do mecanismo pelo qual o dissulfiram exerce seus efeitos anti-álcool tem fornecido evidências para a formação de um intermediário reativo que é um potente agente carbamilante para grupos sulfidríla (Madan *et al.*, 1995). No organismo, esta droga é rapidamente e completamente reduzida a dietilditiocarbamato (DETC) (Cobby *et al.*, 1977), um conhecido inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) (Guzik *et al.*, 2005) e que forma conjugados com a *N*-acetilcisteína (NAC) (Hu *et al.*, 1997). O DETC já teve sua atividade relatada para vários protozoários parasitas, a exemplo de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e algumas espécies do gênero *Plasmodium* (Giulivi *et al.*, 1988; Bouma *et al.*, 1998; Deharo *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* possui uma larga distribuição mundial, causando síndrome da má absorção, perturbações intestinais, com dores abdominais, eliminação de fezes diarréicas e eventualmente esteatorréia. Artrite reativa também tem sido relacionada ao parasitismo por *G. Lamblia*. (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003). Vários relatos têm associado a prevalência de doenças infecciosas intestinais e status nutricional afetando ainda mais a função cognitiva, aproveitamento escolar e desenvolvimento físico de crianças (Olness, 2003).

Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, o que aumenta as taxas de prevalência nestes locais, chegando em torno de 30%, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS, 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002). Em 2004, *Giardia* foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido à sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006).

Doenças diarréicas são a causa principal de morbidade na maioria dos países em desenvolvimento (Pimentel *et al.*, 2007). A este respeito, o advento de novas drogas seguras e eficazes na terapia contra a giardíase, aliado a programas preventivos em regiões endêmicas para esta doença, poderiam reduzir consideravelmente os custos com o tratamento (Savioli *et al.*, 2006). Os impactos sócio-econômicos oriundos de políticas que promovem a saúde pública incluem uma melhor formação de recursos humanos, pela melhora do desenvolvimento cognitivo de crianças, com concomitante aumento na geração de postos de trabalho. Por consequência, haveria uma melhora na qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Nosso trabalho tem como objetivo geral o estudo do mecanismo de ação do dietilditiocarbamato (DETC) em trofozoítos de *Giardia lamblia*, objetivando uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais no tratamento contra a giardíase.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinação da suscetibilidade parasitária (IC_{50}) através de ensaios de proliferação.
- 2) Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.
- 3) Avaliação dos danos oxidativos celulares, por quantificação bioquímica da peroxidação lipídica induzida pelo DETC.
- 4) Quantificação colorimétrica de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 5) Análise por microscopia para localização da expressão de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*, através de sonda fluorescente.
- 6) Detecção de radicais livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*, pelo uso de sonda fluorescente.
- 7) Elucidação dos efeitos microbicidas do fármaco por microscopia eletrônica de transmissão, para a observação da ultraestrutura celular do parasito, possivelmente permitindo a compreensão do modo de ação do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2. Cultivo de *Giardia lamblia*

A cepa de *G. lamblia* a ser utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof^o. Dra. Frances D. Gillin, do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB são axenicamente cultivados em tubos cônicos de vidro (aproximadamente 10 mL), em meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina e 10% (volume/volume) de soro bovino inativado a 56°C por uma hora (Keister, 1983), à temperatura de 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 a 72 horas.

O meio TYI-S-33 é preparado com a seguinte composição: 19,5 mg/mL de caseína, 10,5 mg/mL de extrato de levedura, 10 mg/mL de dextrose, 2 mg/mL de cloreto de sódio, 0,6 mg/mL de fosfato de potássio monobásico, 1 mg/mL de fosfato de potássio dibásico, 2 mg/mL de L-cisteína, 1 mg/mL de bile bovina e 0,2 mg/mL de ácido ascórbico. O pH é ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1N. O meio é esterilizado em filtro a vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

4.3. Ensaio de inibição

Inóculos de 1 a 2 x 10⁵ trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DETC e/ou metronidazol, por 24 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Inóculos de 1×10^6 esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 μL de [^3H]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1 $\mu\text{Ci/poço}$, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5. Detecção de tióis totais

Inóculos de 2×10^4 trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em tubos de 15 mL por 60-72 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC e/ou metronidazol. Em seguida as células foram centrifugadas a 500 X g por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM, pH 8,2. A 20 μL da amostra foram adicionados 75 μL do mesmo tampão, 25 μL do reagente DTNB e 400 μL de metanol, sendo após centrifugado a 1500 X g por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

4.6. Lipoperoxidação

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC e/ou N-acetilcisteína (NAC). Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação a 500 X g por 10 minutos em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após centrifugação, 200 μL de 0,1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados a 200 μL de células em suspensão e incubados a 100°C por 3 horas. A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida a 532 nm e a absorbância foi comparada ao padrão obtido usando 0.1% TBA e PBS, à proporção de 1:1.

4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca/Mg, pH 7,2 por centrifugação a 500 X g por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo 25 μM da sonda 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Molecular

Probes). Após o período de incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes, montados em lâminas e observados ao microscópio de fluorescência.

4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol

Trofozoítos foram fixados por 30 min a 4°C em 1% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Para a adesão dos trofozoítos, as lamínulas foram lavadas com extran neutro, submersas em etanol 70% e secas sem contato manual. Foram colocadas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro e recobertas com solução de 0,1 % de poli-*L*-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Retirado o excesso desta solução, as lamínulas foram secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e, novamente, secas. As células aderidas por 30 minutos às lamínulas foram incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propilgalato e observadas no microscópio de fluorescência.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento com as drogas, as células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio neste tampão. Em seguida os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e infiltrados em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por 48 hs a 60°C, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 400 e contrastados em 5% de acetato de uranila e 15% de citrato de chumbo. As grades são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.10. Análise estatística

Os dados obtidos estão representados como a média \pm desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível

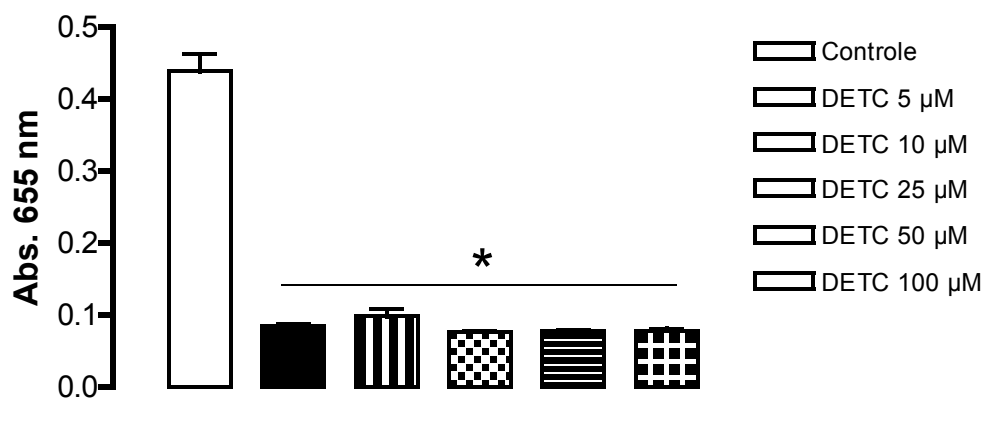
de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de *G. lamblia*

Para avaliar a atividade inibitória do DETC na proliferação celular de *G. lamblia*, nós realizamos experimentos de dose-resposta, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM , por 24 horas. O DETC diminuiu significativamente a proliferação dos trofozoítos, não havendo diferença significativa entre as concentrações utilizadas, presumivelmente por uma ausência de efeito giardicida dose-dependente nestas concentrações (Fig. 4A). O valor de IC_{50} do DETC foi aproximadamente de 2,0 μM , o que demonstra a efetividade do DETC contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, tendo seu efeito comparado ao metronidazol, com valores de IC_{50} em torno de 1,5 μM . Apesar de discreto, aparentemente há uma relação de dose-dependência para o efeito inibitório do metronidazol neste parasito nas concentrações utilizadas (Fig. 4B).

(A)



(B)

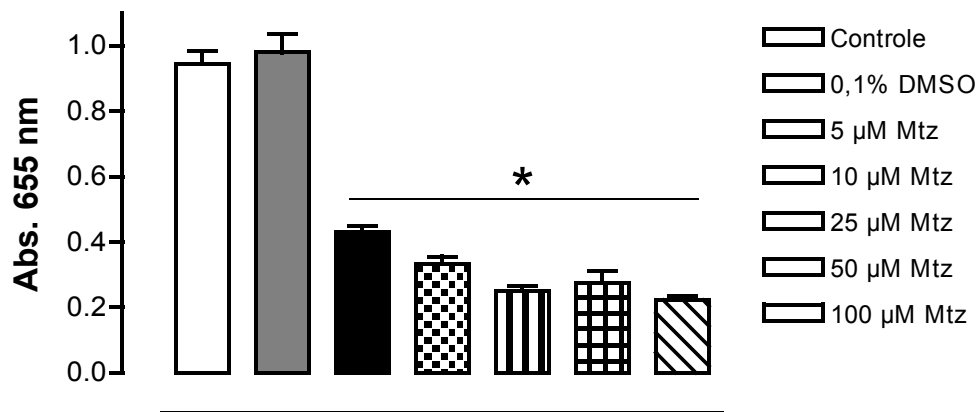


Figura 4. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular. Trofozoítos de *Giardia lamblia* expostos a diferentes concentrações de DETC e metronidazol. (A) Após 24 horas de incubação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com DETC, porém o efeito não foi dose-dependente nas concentrações testadas. (B) Em células tratadas com o metronidazol, observamos uma inibição significativa do crescimento em comparação com as células tratadas com 0,1% de DMSO, havendo uma redução dose-dependente discreta na proliferação entre 5 25 µM de concentração da droga. (*, $p < 0,001$).

5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação da concentração inibitória do DETC e metronidazol neste protozoário, nós avaliamos a associação de ambas as drogas para verificar um possível efeito sinérgico em trofozoítos de *G. lamblia*. Em células tratadas com 1 μM de DETC por 24 horas, não houve uma inibição significativa do crescimento, bem como em parasitos tratados com 1 μM de metronidazol, nas mesmas condições (Fig. 5). Quando nós fizemos as associações do DETC com o metronidazol, em diferentes concentrações de ambas e em um mesmo período de incubação, verificamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e algumas combinações, especialmente quando a concentração do metronidazol está acima de 0,5 μM , o que não ocorre quando comparamos estas combinações com o DETC ou metronidazol isoladamente (Fig. 5). Estes resultados sugerem que não há um efeito sinérgico entre estes compostos em trofozoítos de *Giardia lamblia* nas concentrações utilizadas, já que os valores de IC_{50} de ambas as drogas se encontram próximos aos valores empregados experimentalmente neste estudo.

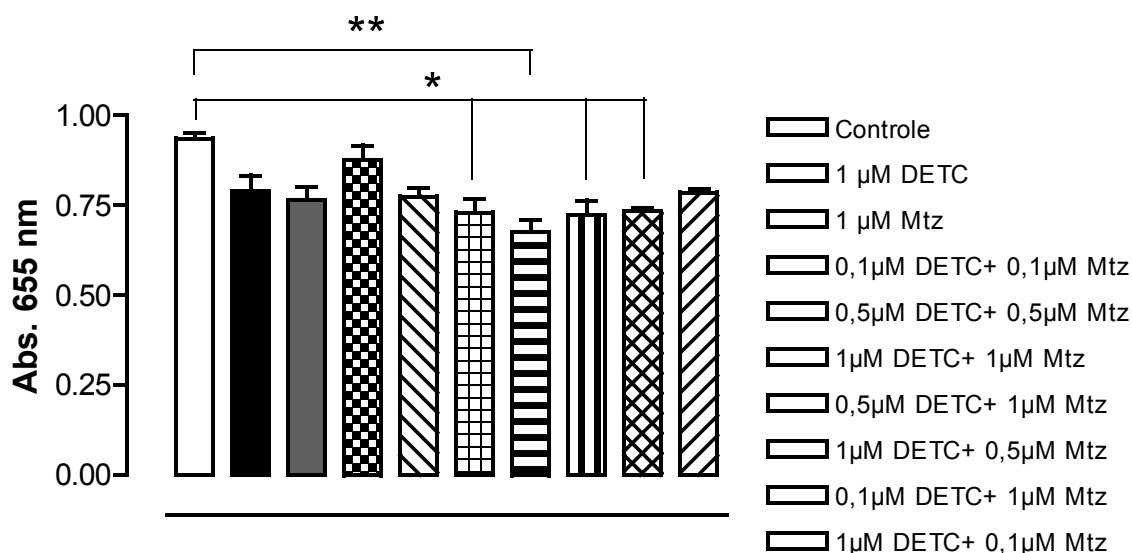


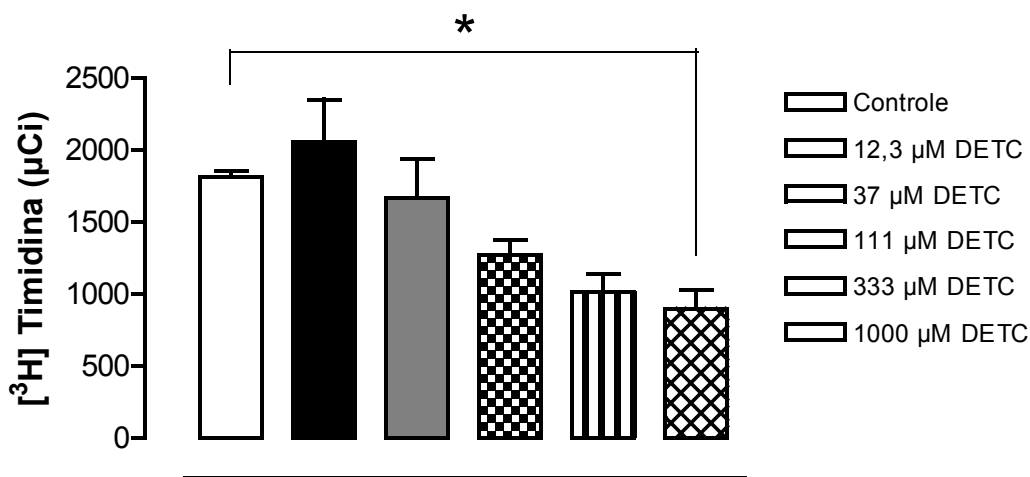
Figura 5. Avaliação de possível sinérgismo entre DETC e metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*. As células foram incubadas com ambas as drogas em diferentes combinações ou isoladamente, por 24 horas. Houve uma inibição estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; **, $p <$

0,01) da proliferação celular em parasitos tratados com concentrações mais elevadas de ambas as drogas, porém os resultados não indicam efeito sinérgico desta associação.

5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos do DETC em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com DETC, verificamos uma diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Fig. 6A). O valor de IC₅₀ para este composto em esplenócitos foi cerca de 217 µM, muito acima dos valores encontrados para seu efeito giardicida. O metronidazol não causou citotoxicidade em esplenócitos (Fig. 6B) nas mesmas concentrações utilizadas para o DETC, sugerindo que estas células são menos suscetíveis à ação do 5-nitroimidazol em comparação ao tiocomposto. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o DETC causa seu efeito citotóxico em células do baço difere significativamente do utilizado para ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

(A)



(B)

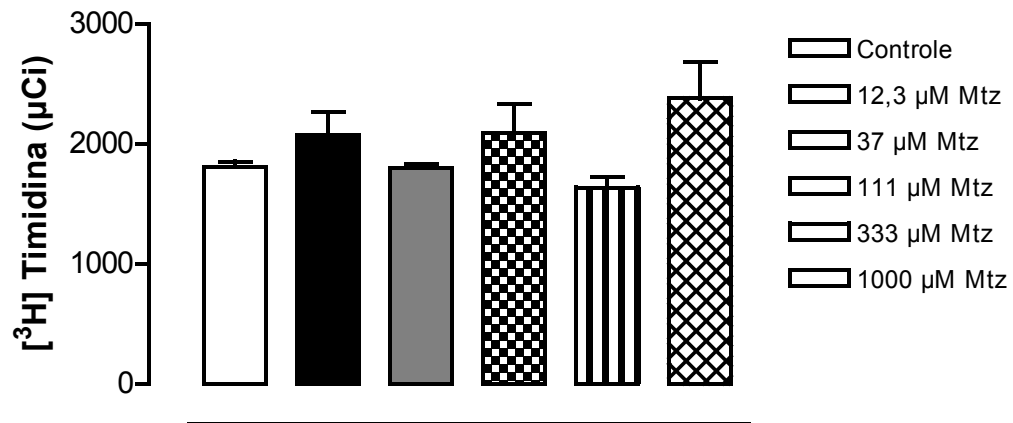


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos. Células do baço de camundongos Balb/C foram tratadas com DETC (A) ou metronidazol (B), por 24 horas. Houve uma redução da taxa de proliferação dos esplenócitos tratados com DETC, indicada pela redução da incorporação de timidina com o aumento da concentração da droga. (* $p < 0,05$). O metronidazol não reduziu a incorporação de timidina destas células, nas mesmas concentrações.

5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para verificar os possíveis efeitos causados pelo DETC neste parasito, testamos se a atividade giardicida desta substância está associada com o conteúdo dos tióis livres através da detecção pela sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA), que se liga seletivamente a grupos tiol em presença de grupamentos amino. Em parasitos controle foi observada uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de algumas células (Fig. 7A). Em parasitos tratados com DETC a 200 μ M por 24 horas, algumas células apresentavam uma marcação com intensidade menor ou ausente em comparação ao controle, indicando que o DETC está bloqueando os tióis da célula (Fig. 7C). Este resultado indica a participação dos tióis livres no efeito giardicida do composto.

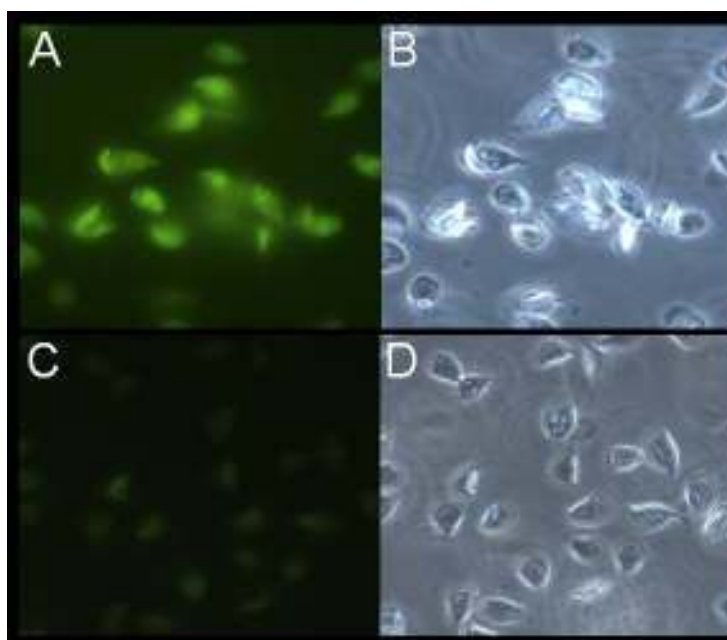


Figura 7. Análise do conteúdo de tióis livres em trofozoítos de *G. lamblia*. Detecção de grupos sulfidríla através da sonda fluorescente *orto*-phthaldialdeído (OPA – A e C). Células controle apresentam uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de alguns trofozoítos (A). Trofozoítos de *Giardia lamblia* tratados com 200 μ M de DETC por 24 horas, apresentando uma fraca marcação (C) em relação ao controle. Visualização das células por microscopia de contraste de fase (B e D).

5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com o objetivo de detectar as concentrações totais de grupos tiol presentes neste parasito, foi utilizado o reagente de Ellman (1959), que determina quantitativamente grupos sulfidril em amostras biológicas. Após 2 horas de incubação com 100 μ M de DETC, foi possível observar um decréscimo do conteúdo de grupamentos tiol totais em comparação ao controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Fig. 8). O metronidazol nas mesmas concentrações não levou à diminuição destes grupos sulfidril, com níveis de detecção comparáveis aos do controle. Quando as células foram incubadas com a associação de ambos, observamos uma diminuição da expressão de grupamentos tiol, porém houve um discreto aumento em comparação ao DETC. Estes resultados sugerem que o DETC diminui a capacidade antioxidante de *G. lamblia* através do decréscimo da expressão de grupos tiol presentes neste parasito, não havendo efeitos aditivos ou sinérgicos entre os compostos.

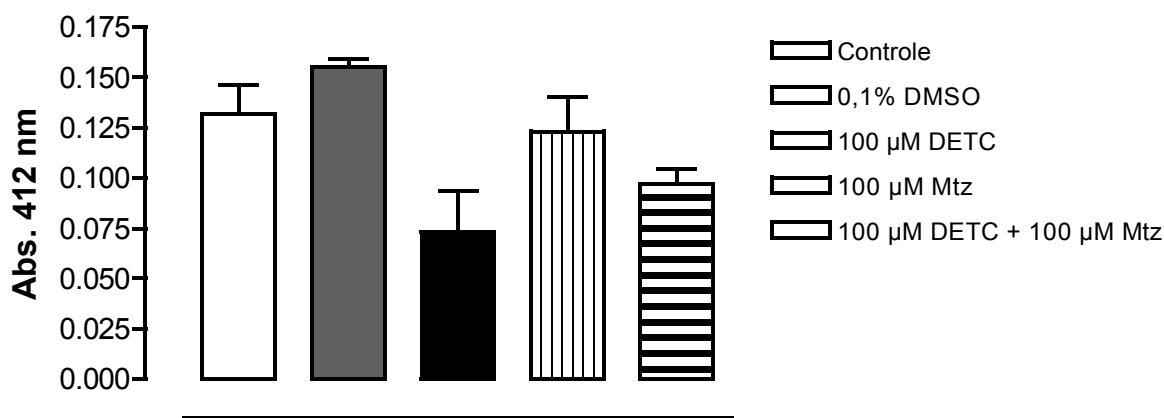


Figura 8. Quantificação dos grupos sulfidril em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Houve uma diminuição dos níveis de tióis totais em células tratadas com 100 μ M de DETC por 2 horas em relação ao controle, porém esta redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Parasitos tratados com metronidazol apresentaram valores semelhantes ao controle e a combinação do DETC com o metronidazol levou a um discreto aumento dos níveis de tióis livres em comparação ao DETC.

5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação dos tióis livres, nós avaliamos a participação destes grupamentos na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*. Em células tratadas com 25 μM de DETC por 24 horas, observamos um decréscimo na proliferação celular em relação às células controle (Fig. 9). A adição de 25 μM de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultura não afetou a proliferação do parasito *in vitro*. A incubação das células com DETC e NAC, ambos a 25 μM , levou à reversão parcial do efeito giardicida do DETC, aumentando discretamente à medida que elevamos a concentração do NAC (Fig. 9). Estes dados indicam que o efeito do DETC nestas células está associado, ao menos parcialmente, com os grupamentos tiol presentes neste parasito, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, já que a NAC não foi capaz de reverter totalmente os efeitos causados pelo DETC.

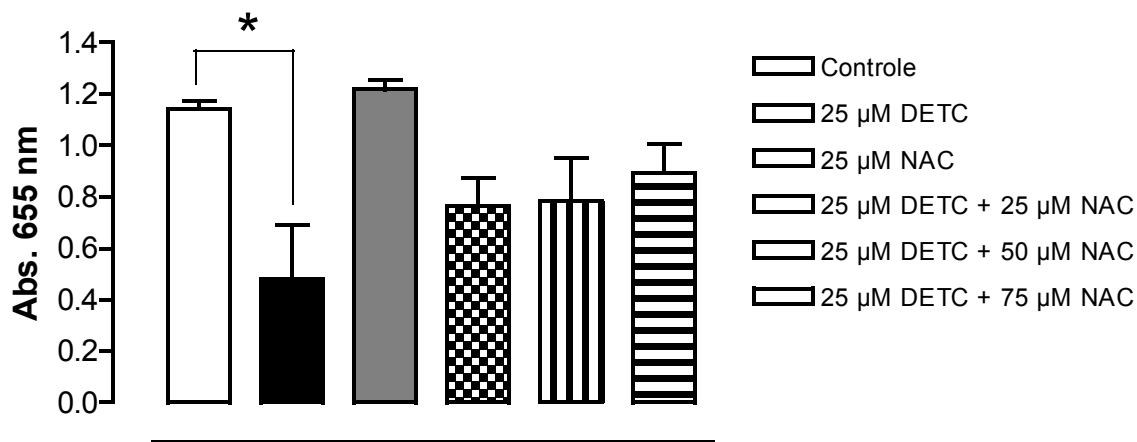
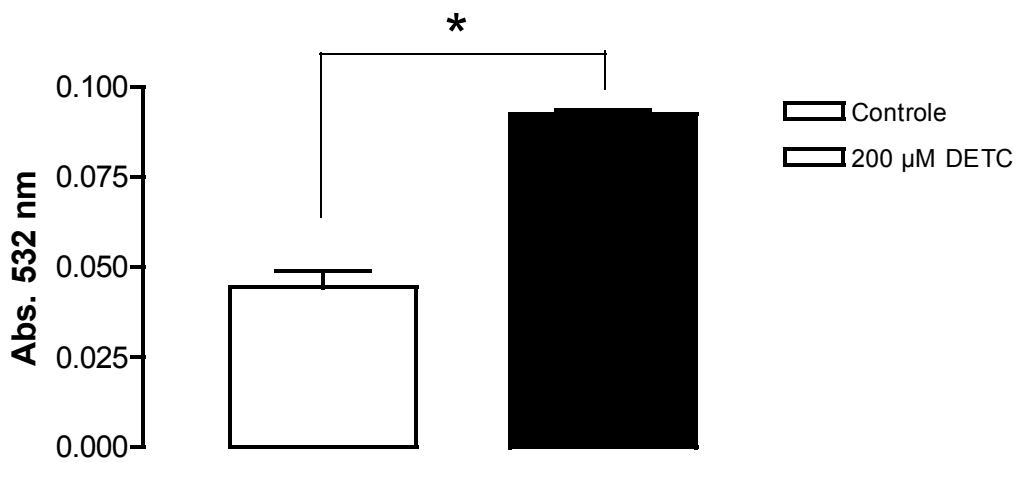


Figura 9. Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de *Giardia* em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC). Células tratadas com 25 μM de DETC apresentaram uma redução na proliferação em comparação ao controle (*, $p < 0,05$). Quando associamos o NAC ao DETC em diferentes proporções há uma reversão parcial do efeito inibitório do DETC.

5.7. Quantificação de lipoperoxídeos em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com a observação de que o DETC é capaz de diminuir os níveis de tióis livres neste parasito e por conseqüência a sua capacidade antioxidante, decidimos verificar os danos oxidativos celulares através da quantificação bioquímica da peroxidação lipídica através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas, houve um aumento significativo desta lipoperoxidação (Fig. 10A). A associação do DETC com a NAC foi capaz de reverter a lipoperoxidação causada pelo DETC (Fig. 10B). Estes dados sugerem que o DETC está elevando o estresse oxidativo, sendo este efeito modulado por cisteína, possivelmente pela interação destas duas moléculas com conseqüente inibição da atividade do DETC.

(A)



(B)

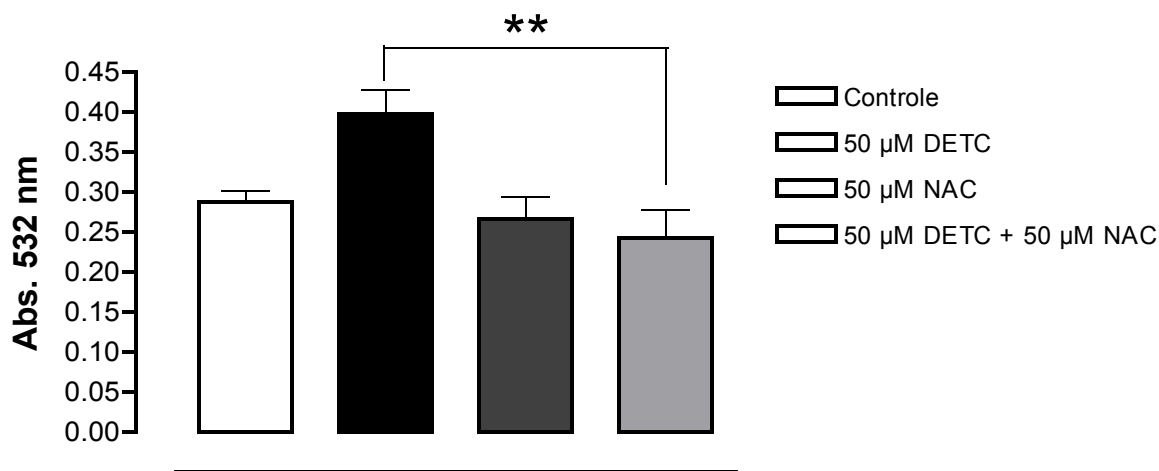


Figura 10. Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células tratadas com 200 μM de DETC por 4 horas apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle (*t* de Student, * $p < 0,001$). (B) Houve uma reversão dos efeitos do DETC quando foi realizado o co-tratamento com a NAC, em parasitos tratados por 2 horas (** $p < 0,05$).

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Como um dos efeitos do DETC é o aumento dos danos oxidativos celulares em trofozoítos de *Giardia*, resolvemos em seguida avaliar a produção espécies reativas através da sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes), que é permeável à membrana celular, se tornando impermeável no espaço intracelular quando se liga a espécies reativas de oxigênio, emitindo fluorescência. A maioria das células controle estavam viáveis, com grande motilidade ou aderidas à lâmina de vidro, não apresentando marcação para a sonda (Fig. 11A - B). Os trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora se encontravam menos móveis e com alterações morfológicas na superfície celular. Nestas células observou-se uma marcação homogênea (Fig. 11C), um pouco mais pronunciada em regiões de protuberância membranosa, conhecidas como “blebs” (Fig. 11D). Assim como no controle, as células tratadas com 200 µM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação para a sonda. Isto provavelmente se deve ao fato de que a grande maioria destas células já estavam mortas, não sendo possível a detecção da sonda intracelularmente (Fig. 11E - F).

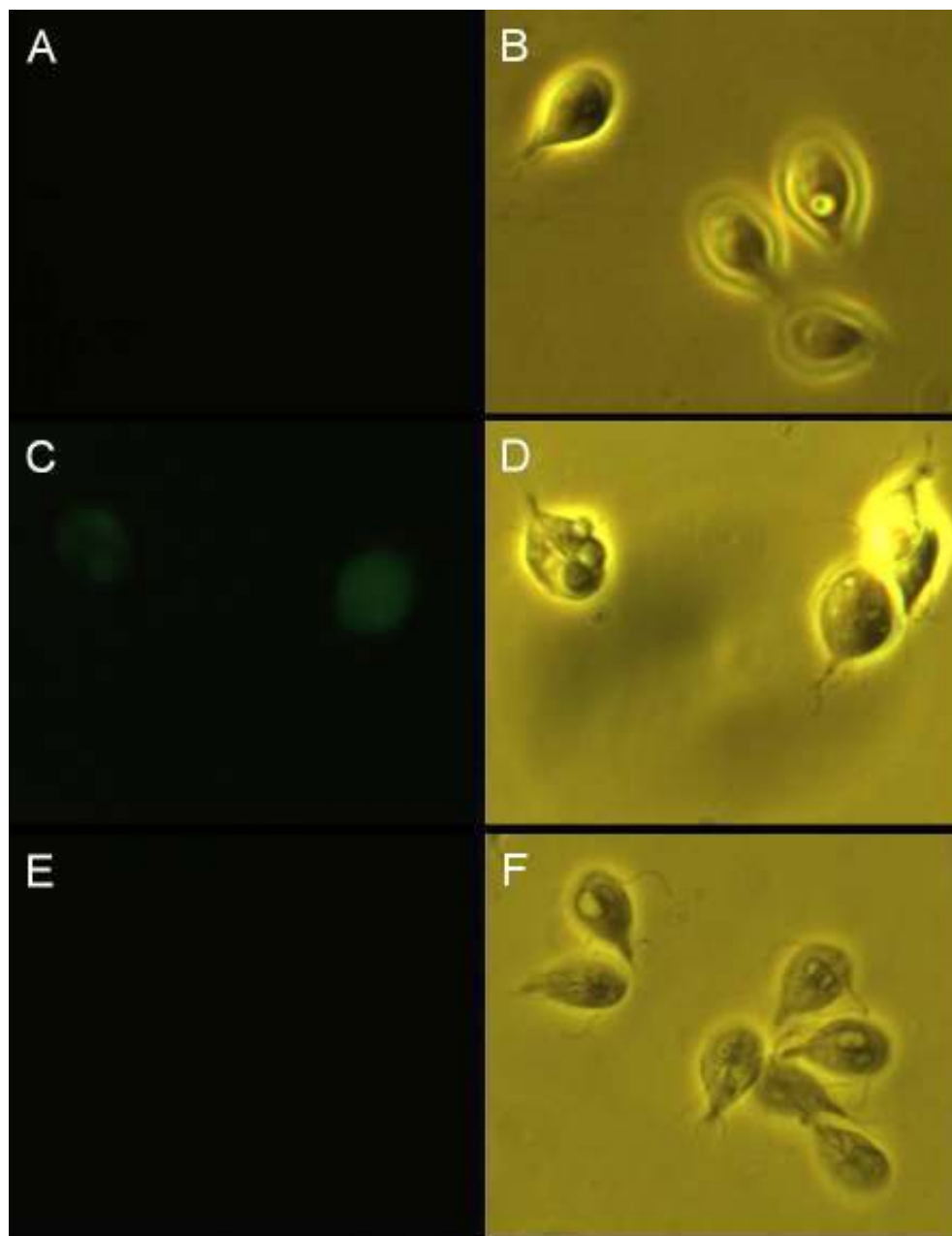


Figura 11. Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia*. A sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para detecção de espécies reativas neste parasito. Células controle não apresentaram marcação. (A e B) O tratamento com 100 μM de DETC por 1 hora levou ao aparecimento de células com alterações morfológicas (D) e marcadas com a sonda fluorescente (C). Trofozoítos tratados com 200 μM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação com H₂DCFDA (E), possivelmente porque estas já estavam mortos (F).

5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC

Para entender melhor os efeitos do DETC em trofozoítos de *G. lamblia*, nós incubamos as células em presença ou ausência de 200 μM desta substância por 24 horas e depois de processadas, foram visualizadas em MET. As células controle apresentavam-se íntegras com uma grande quantidade de partículas de glicogênio e cisternas de retículo endoplasmático distribuída pelo citoplasma (Fig. 12A). Vesículas periféricas foram observadas subjacentes à membrana plasmática (Fig. 12B). Nestas células também podemos verificar em corte transversal estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos, o funis (Fig. 12C) e o disco adesivo (Fig. 12D). Os núcleos, presentes na região anterior dos parasitos, encontravam-se homogêneos, bem delimitados pela membrana nuclear (Fig. 12D). Em parasitos tratados com DETC, mais de 50% das células apresentavam-se com alto grau de extração citoplasmática, inclusive do conteúdo nuclear (Fig. 13A). Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito (Fig. 13B), sugerido pela presença de estruturas virguliformes ou com dupla membrana circunscrevendo porções citoplasmáticas. Possível participação do retículo endoplasmático é sugerida, já que este se encontrava dilatado e próximo às vesículas (Fig. 13C), que também se apresentaram maiores e menos numerosas do que no controle, sugerindo a ocorrência de confluência das mesmas (Fig. 13D).

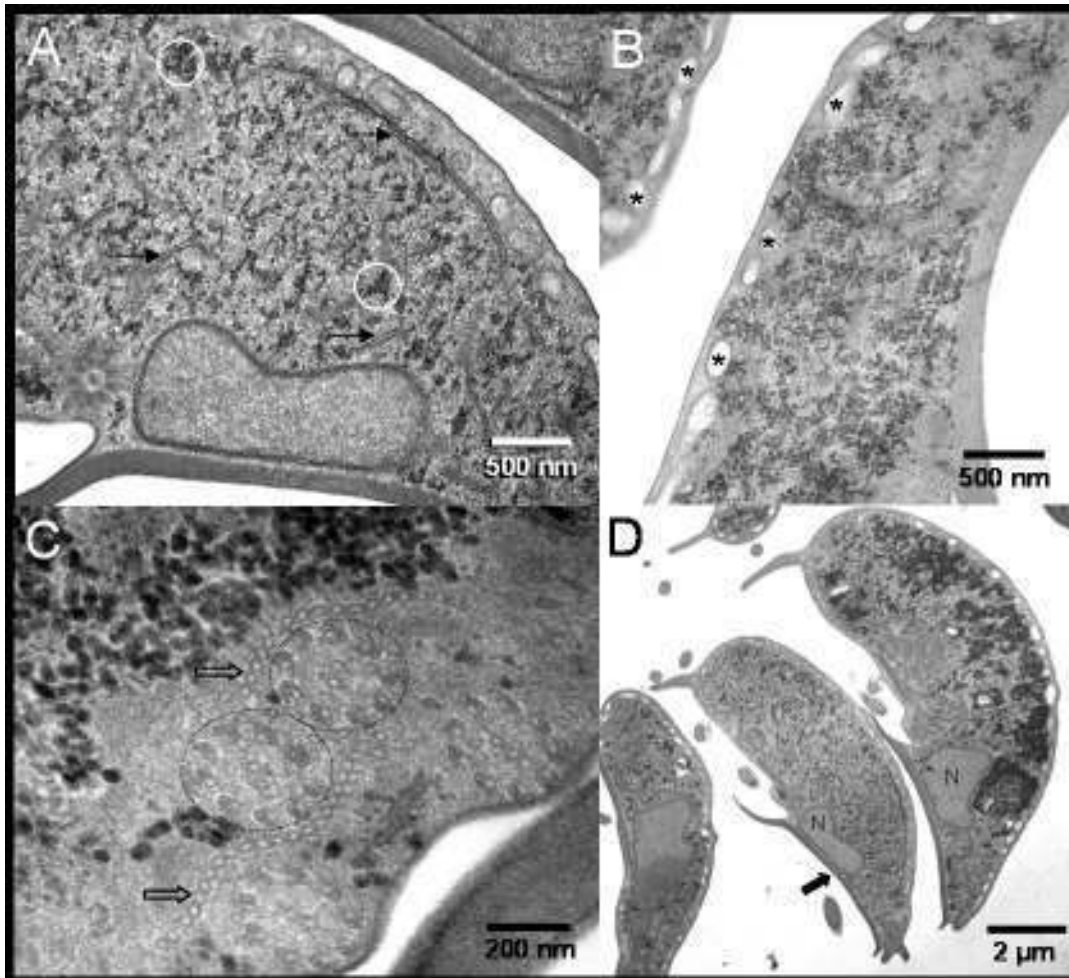


Figura 12. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células controle apresentando citoplasma homogêneo, com grânulos de glicogênio (assinalado por círculos brancos) e retículo endoplasmático (setas). Em (B), visualizamos as vesículas periféricas (*) na região dorsal da célula. (C) Estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (assinalados por círculos pontilhados) e o corpo funis (setas). Em (D), observamos células em corte longitudinal apresentando núcleos (N) e o disco adesivo (seta).

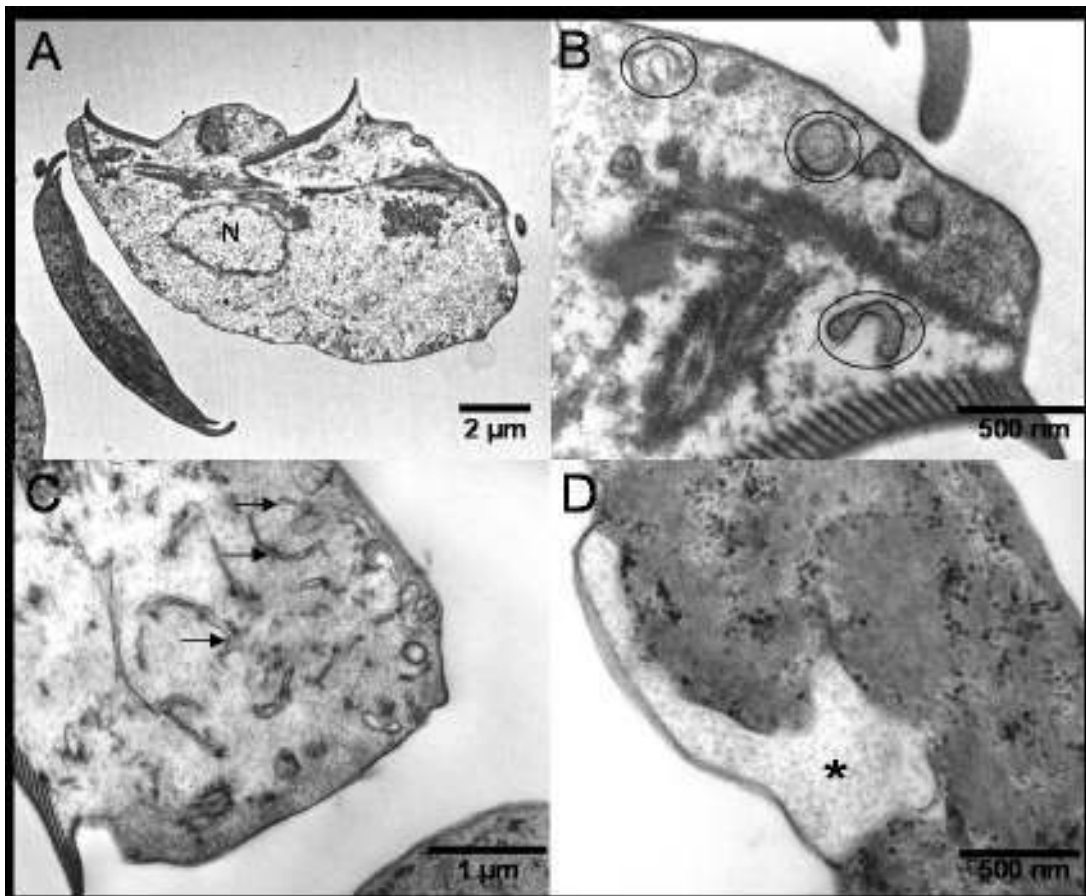


Figura 13. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *G. lamblia* tratados com DETC. (A) Células tratadas com 200 µM de DETC por 24 horas apresentando reduzida eletrondensidade de citoplasma e nucleoplasma, em comparação às células controle (Fig. 12). (B) Visualização de vesículas virguliformes ou com dupla membrana (assinaladas por círculos), sugerindo possíveis processos autofágicos. Em (C), observamos este mesmo processo, com provável participação do retículo endoplasmático, que se encontra mais dilatado quando comparado ao controle. Em (D), visualizamos uma célula apresentando grande compartimento alongado, presumivelmente formado pela fusão homofílica das vesículas periféricas.

6. DISCUSSÃO

A elucidação dos efeitos do DETC, um conhecido inibidor de SOD, é de importância fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em sua atividade giardicida, já que a ausência de SOD em *Giardia* nos permite evidenciar a existência de efeitos independentes desta enzima, produzidos pela ação do DETC em protozoários parasitas.

Apesar de ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, a inibição da proliferação celular pelo DETC aparentemente não é dose-dependente. Uma das possíveis explicações para este fato é que esta substância pode ser oxidada de forma muito rápida, principalmente em soluções, perdendo parte da sua atividade. Outra possibilidade é que o composto atue sobre um limitado “pool” de resíduos de cisteína, assim o efeito atingiria um plateau ao reagir com os grupos SH disponíveis. A manipulação deste composto precisa ser feita com presteza, evitando sua exposição ao ar e/ou aumento da temperatura. Embora seja uma droga relativamente instável, seu efeito giardicida é bastante satisfatório, com níveis comparáveis ao do metronidazol *in vitro*.

O dissulfiram, medicamento utilizado no tratamento contra o alcoolismo, age como um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Brien & Loomis, 1985). Este fármaco sofre rápida redução enzimática no sangue pela glutatona redutase (Strömme, 1963; Cobby *et al.*, 1977), mas pode também ser reduzido de forma não enzimática pela albumina (Agarwal *et al.*, 1983). Subseqüentemente, DETC é metabolizado por tiol metiltransferase ou tiopurina metiltransferase a DETC-Me (Gessner & Jakubowski, 1972; Glauser *et al.*, 1993; Lill *et al.*, 1996), que sofre oxidação principalmente pelo citocromo P-450, com uma contribuição minoritária de flavina monooxigenases (Johansson *et al.*, 1989). Os metabólitos oxidados do dissulfiram têm sido descritos como potentes inibidores da ALDH, através da carbamilação de um grupo tiol crítico no sítio ativo da enzima (Jin *et al.*, 1994; Tonkin *et al.*, 2003).

Por ser reduzido rapidamente *in vivo* a DETC, o dissulfiram se torna uma poderosa ferramenta quimioterápica no tratamento contra a giardíase. Este fármaco já foi testado *in vitro* e *in vivo* contra *Giardia lamblia* (Nash & Rice, 1998), com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para o DETC com trofozoítos *in vitro*.

Quando analisamos a associação do DETC com o metronidazol, verificamos que não houve um efeito sinérgico entre estas duas drogas. Em *Entamoeba histolytica*, o metronidazol é

capaz de se ligar covalentemente a algumas proteínas específicas, incluindo superóxido dismutase e tioredoxina redutase, esta última sendo uma das responsáveis pela ativação do metronidazol neste protozoário através da redução do grupo nitro (Leitsch *et al.*, 2007). Além disso, os níveis de cisteína são reduzidos com a adição do metronidazol, provavelmente pela reação desta droga com os grupos sulfidríla acessíveis neste parasito (Leitsch *et al.*, 2007). Como a tioredoxina redutase é uma enzima muito comum, é provável que processos similares ocorram em outros organismos procarióticos e/ou eucarióticos. Nesse sentido, o efeito giardicida do DETC e metronidazol pode estar associado à competição de ambas as drogas pelos mesmos mecanismos de ativação em *Giardia lamblia*, que apresenta uma enzima semelhante à tioredoxina redutase, a dissulfeto redutase (Brown *et al.*, 1996b) e proteínas ricas em cisteína (Luján & Nash, 1994). Em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, o mecanismo deste 5-nitroimidazol está relacionado à sua redução pela piruvato:ferredoxina oxidorreductase a radicais citotóxicos que levam a danos irreversíveis e morte celular (Müller, 1986). Apesar disso, resistência ao metronidazol em *E. histolytica* pode ser atribuída à diminuição de enzimas antioxidantes, como peroxiredoxina (Wassmann *et al.*, 1999) e superóxido dismutase (Samarawickrema *et al.*, 1997), assim como em *G. lamblia*, onde o aumento da atividade da enzima NADH oxidase tem sido associado a cepas resistentes ao metronidazol (Ellis *et al.*, 1993).

Alguns trabalhos têm desencorajado a utilização do dissulfiram e metronidazol em associação, principalmente pelo acúmulo de acetaldeído causado pela inibição da enzima ALDH por estes fármacos (Gardner & Hill, 2001) em pacientes que fazem ingestão de álcool, levando ao efeito “antabuse” (sensação de calor, náusea, vômitos e taquicardia) (Finegold, 1980; Edwards *et al.*, 1986; Krulewitch, 2003). A utilização destas duas drogas em conjunto poderia potencializar este efeito, além de causar em alguns pacientes reações psicóticas, conforme alertado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu bulário eletrônico.

Quando analisamos a incorporação de timidina por células do baço na presença de diferentes concentrações de DETC ou metronidazol, observamos que não houve uma diferença significativa nos níveis de incorporação entre as células controle e tratadas com o metronidazol. No entanto, o DETC apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas concentrações acima de 111 μM . Apesar disso, o valor de IC_{50} encontrado para trofozoítos de *Giardia* (*i.e.* 2 μM) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A farmacocinética e os efeitos colaterais do dissulfiram têm sido extensivamente estudados, gerando dados para a elaboração de formulações e regimes terapêuticos apropriados. Sua biodisponibilidade é maior que 80% após administração oral e a eliminação do dissulfiram e seus metabólitos é um processo lento. Aproximadamente 20% da droga permanece no corpo após 1 a 2 semanas (Ellenhorn *et al.*, 1997 *apud* Sauna *et al.*, 2005). Apesar de ser recomendado o monitoramento de pacientes que usam altas doses do dissulfiram (acima de 250 mg por dia) (Fuller & Gordis, 2004), existem poucos efeitos colaterais associados com longos períodos de tratamento. Hepatotoxicidade é a causa mais comum de preocupações durante a utilização do dissulfiram (Sauna *et al.*, 2005), contudo este efeito adverso é geralmente reversível quando seu uso é interrompido na presença de manifestações clínicas (Wright *et al.*, 1988). A excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais graves tornam o dissulfiram uma droga segura e eficaz, inclusive com aprovação pela FDA e ANVISA.

A redução nos níveis de grupamentos tiol em trofozoítos tratados com DETC foi observada tanto por microscopia de fluorescência, quanto pela avaliação quantitativa através do reagente de Ellman (DTNB). Estes resultados sugerem que o DETC esteja carbamilando e/ou formando pontes dissulfeto com grupamentos tiol livres que estão presentes em *Giardia* e que são responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito, a exemplo das proteínas ricas em cisteína e dissulfeto redutase. De modo interessante, a atividade do dissulfiram em trofozoítos de *G. lamblia* foi reduzida pela adição de cisteína ao meio (Nash & Rice, 1998), sugerindo que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga. O metronidazol também reduziu os níveis de tióis totais em *Giardia*, porém não houve diferenças entre o tratamento com as drogas feito isoladamente ou em conjunto.

Cepas de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol estão associadas a um aumento da atividade da enzima NADH oxidase, possibilitando a detoxificação de espécies oxidativas (Ellis *et al.*, 1993). É provável que cepas sensíveis ao metronidazol sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, já que estas apresentam diminuição do consumo de O₂ (Ellis *et al.*, 1993), com possível redução dos níveis de grupos sulfidril livres, que podem ser oxidados através da ativação do grupo nitro deste fármaco.

Para confirmar o papel dos grupamentos tiol no efeito giardicida do DETC, nós incubamos os trofozoítos de *Giardia* em concentrações crescentes de NAC, associadas ou não a este composto. Não houve diferenças significativas entre células tratadas com 25 µM de NAC e o

grupo controle, porém houve uma diminuição significativa da proliferação celular quando adicionamos 25 μ M de DETC ao meio de cultura. A pré-incubação do NAC com o DETC na proporção 1:1 reverteu parcialmente a inibição, aumentando discretamente à medida que esta proporção de NAC foi aumentada. A presença de resíduos de cisteína tem sido enfatizada na literatura como um fator de crescimento essencial para *Giardia lamblia* (Luján & Nash, 1994), conferindo proteção contra os efeitos letais do oxigênio (Fairlamb, 1989). As análises de incorporação de L-cisteína por este parasito indicam a presença de ao menos dois sistemas de transporte. L-cistina não foi incorporada pelos trofozoítos, sugerindo a ausência de um sistema de transporte e a especificidade dos transportadores de cisteína. *Giardia* não é capaz de sintetizar cisteína ou metionina a partir de sulfato, nem de converter metionina em cisteína, sendo assim o protozoário é auxotrófico para este aminoácido (Luján & Nash, 1994).

As CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície (VSPs), são os principais antígenos de *Giardia lamblia*. Cerca de 150 diferentes genes que codificam estas proteínas tem sido identificados no genoma deste parasito. Somente uma VSP é expressa por trofozoíto, permitindo que *Giardia* mude a expressão desta proteína em sua superfície (Nash, 2002). O mecanismo desta variação antigênica ainda não está claro, mas este não envolve rearranjo de DNA e é refletido por mudanças na expressão gênica em nível de RNA mensageiro (Nash, 2002). Diferenciação pode induzir variação antigênica *in vitro* (Svärd *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002;) e *in vivo* (von Allmen *et al.*, 2004). Análises de anticorpos IgA anti-*Giardia* em leite materno de mães que vivem em área endêmica de giardiase, provavelmente com múltiplas infecções com diferentes cepas de *Giardia*, revelou que as VSPs são as proteínas imunorreativas dominantes (Téllez *et al.*, 2005).

Estes dados nos indicam que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga, apesar de não ser o único. Em 1930, o dissulfiram começou a ser utilizado como escabicida e vermicida por ser um quelante de cobre, um componente essencial da cadeia respiratória de artrópodes e helmintos (Eneanya *et al.*, 1981). A atividade quelante de metal também é relatada para o DETC, que é um específico inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (Pritsos *et al.*, 1989; Majid & Nishiyama, 2002). As proteínas com motivos dedo de zinco são essenciais para o funcionamento celular normal (Berg & Shi, 1996), tornando-se um importante alvo terapêutico (Rein *et al.*, 1997). *Giardia* expressa altos níveis de CRP na superfície, as quais

possuem motivos de zinco (Luján *et al.*, 1995c). O zinco pode ser quelado pelo DETC, se apresentando como uma outra via de atuação desta droga neste parasito.

Os danos oxidativos celulares em membranas de trofozoítos tratados com DETC foram avaliados através da formação de um produto citotóxico, o malondialdeído (MDA), que se liga ao TBA gerando uma reação colorimétrica indicativa da peroxidação lipídica (Bellé *et al.*, 2004). Houve um aumento significativo da lipoperoxidação em parasitos tratados com 200 μ M DETC, por 4 horas. O metronidazol levou a um aumento discreto da peroxidação lipídica e a associação entre o DETC e o metronidazol não elevou significativamente a peroxidação, com níveis comparáveis ao DETC utilizado isoladamente, provavelmente porque a concentração do DETC já estava alta, levando ao plateau da peroxidação celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, no entanto as membranas são um dos componentes mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997). Este processo pode levar à morte celular através de alterações na estrutura e permeabilidade de membrana, levando à perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas (Hershko, 1989). O NAC foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do DETC, demonstrando a importância dos grupamentos tiol no mecanismo de ação desta droga.

Baseado na confirmação de que o DETC promove lipoperoxidação, provavelmente pelo aumento da geração de radicais livres de oxigênio, resolvemos avaliar a produção de espécies reativas por esta droga em *Giardia lamblia* com a sonda fluorescente H₂DCFDA. As células controle não apresentaram marcação para a sonda, enquanto que trofozoítos tratados com 100 μ M de DETC por 1 hora foram marcados de forma homogênea, demonstrando que este tiocomposto está aumentando a formação de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Isto se deve ao fato de que a redução de grupos sulfidril livres pode estar afetando o potencial redutor deste parasito, levando ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo não pôde ser visualizado em células tratadas com 200 μ M de DETC, possivelmente porque estas já se encontravam mortas.

Os metabólitos mais comuns produzidos pela utilização do oxigênio em organismos aeróbicos são o radical superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que participa da reação que produz o radical hidroxila (OH[•]), sendo este último extremamente reativo (Cadenas, 1989). Superóxido é usualmente detoxificado pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água por catalase, peroxidase e a enzima dependente de glutatona, glutatona

peroxidase (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). Além destas enzimas de detoxificação convencionais, mecanismos alternativos podem ser utilizados para diminuição do estresse oxidativo celular, que incluem as dioxigenases e monooxigenases (citocromo P-450 redutase) (Malmström, 1982). Algumas oxidases dependentes de flavina (NADH oxidase) reduzem tetravalentemente o oxigênio a água, abolindo a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em bactérias anaeróbicas (Schmidt *et al.*, 1986), assim como a NADH peroxidase, uma flavoenzima envolvida na redução do peróxido que também desempenha papel antioxidante em algumas células (Stanton & Jensen, 1993).

Alguns protozoários microaerófilos também possuem NADH oxidase. *Entamoeba histolytica* contém uma NADPH oxidase dependente de flavina que produz peróxido quando purificada (Lo & Reeves, 1980). *Trichomonas vaginalis* contém uma flavo-oxidase que produz água, além de uma NADPH oxidase produtora de peróxido (Linstead & Bradley, 1988). *Giardia* também apresenta atividades oxidase e peroxidase dependentes de NADH (Brown *et al.*, 1996a; Brown *et al.*, 1998), responsáveis pela capacidade deste parasito de detoxificar o oxigênio. As principais enzimas de detoxificação de espécies oxidantes, como a SOD, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase não estão presentes neste protozoário, salientando a importância da manutenção de um ambiente intracelular redutor através da ciclagem redox pelos grupos sulfidril presentes em *Giardia*.

A elucidação dos efeitos microbicidas do DETC foi possibilitada pela microscopia eletrônica de transmissão, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 200 μM de DETC por 24 horas, houve um alto grau de extração citoplasmática, apresentada por mais de 50% das células. Este efeito é causado provavelmente pelo colapso do potencial de membrana, com conseqüente rompimento da membrana plasmática pelo aumento do estresse oxidativo (Lloyd *et al.*, 2000), onde a indução de radicais livres de oxigênio leva a uma inativação de sistemas que consomem oxigênio, acúmulo de peróxido de hidrogênio e oxidação de grupos tiol.

Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito, sugeridos pela presença de estruturas virguliformes ou com membrana dupla, que são semelhantes à formação dos vacúolos em organismos eucariotos (Suzuki & Ohsumi, 2007; Xie & Klionsky, 2007).

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento de sua homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Os mecanismos

envolvem a formação de uma estrutura de dupla membrana dentro da célula, chamada de vacúolo autofágico ou autofagossomo, a partir do retículo endoplasmático e vias secretórias iniciais. A fusão com o lisossomo gera o autofagolisossomo, onde as enzimas hidrolíticas agem na degradação do conteúdo interno (Shintani & Klionsky, 2004). Resposta a condições de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismos de autofagia. É possível que *Giardia* também utilize destes mecanismos para evitar a perda da homeostasia com o aumento do estresse oxidativo, como ocorre em outros tipos celulares (Hill *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

A observação de vesículas que se encontravam maiores e menos numerosas em comparação ao controle nos leva a crer que ocorreu a fusão homofílica destes compartimentos. Este processo pode ter sido mediado por pontes dissulfeto que se formam pela ação do DETC entre as cisteínas das proteínas celulares, conferindo uma modificação da conformação tridimensional à molécula, expondo sítios de reconhecimento e/ou catalíticos e ocasionando uma série de alterações na morfologia e funcionamento normais da célula.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem do estresse oxidativo e conteúdo de grupos tiol podem prover valiosas estratégias terapêuticas para a giardíase.

7. CONCLUSÕES

7.1. O DETC mostrou-se efetivo na inibição da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, porém este efeito aparentemente não é dose-dependente;

7.2. A associação do DETC com o metronidazol não levou a um efeito sinérgico *in vitro*;

7.3. O DETC promove a redução dos níveis de grupos sulfidril livres, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto e/ou carbamilações em moléculas ricas em cisteína que estejam com estes grupamentos tiol acessíveis, como as CRPs, uma das responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito;

7.4. O aumento do estresse oxidativo em trofozoítos de *G. lamblia* pode ser devido à diminuição da capacidade antioxidante deste protozoário, inviabilizando a sua sobrevivência;

7.5. Os resultados apresentados neste trabalho apontam para uma nova abordagem na terapia contra a giardíase. Estudos para avaliação dos efeitos do DETC *in vivo* se colocam como perspectivas em nosso trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ADAGU, I.S., NOLDER, D., WARHURST, D.C., ROSSIGNOL, J.F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, 49:103-11, 2002.

ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, 14: 447-75, 2001.

AGARWAL, R.P., MCPHERSON, R.A., PHILLIPS, M. Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 42: 293-310, 1983.

AL-MEKHLAFI, M.S., AZLIN, M., NOR AINI, U., SHAIK, A., SA'IAH, A., FATMAH, M.S., ISMAIL, M.G., AHMAD FIRDAUS, M.S., AISAH, M.Y., ROZLIDA, A.R., NORHAYATI, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 686-91, 2005.

APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, 21: 370-6, 2005.

BASSILY, S., FARID, Z., EL-MASRY, N.A., MIKHAIL, E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J Trop Med Hyg**, 90: 9-12, 1987.

BELLÉ, N.A., DALMOLIN, G.D., FONINI, G., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 22: 245-51, 2004.

BENCHIMOL, M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett**, 1:81-7, 2004.

BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, 511: 133-44, 2002.

BERG, J.M., SHI, Y.. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, 23: 1081-5, 1996.

BERNANDER, R., PALM, J.E., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol**, 3: 55-62, 2001.

BIAGINI, G.A., PARK, J.H., LLOYD, D., EDWARDS, M.R. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. **Microbiology**, 147: 3359-65, 2001.

BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharm. J**, 234: 271-4, 1991.

BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J.P. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**, 42: 817-20, 1998.

BRAR, S.S., GRIGG, C., WILSON, K.S., HOLDER, W.D., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A.J., WHORTON, A.R., STOWELL, G.W., WHITTALL, L.B., WHITTLE, R.R., WHITE, D.P., KENNEDY, T.P.. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol Cancer Ther.** 3: 1049-60, 2004.

BREWER, C. How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. **Br J Psychiatry**, 144: 200-2, 1984.

BRIEN, J.F., TAM, G.S., CAMERON, R.J., STEENAART, N.A., LOOMIS, C.W. A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrahydrothiazole, calcium carbimide, and disulfiram. **Can J Physiol Pharmacol**, 63: 438-43, 1985.

BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., EDWARDS, M.R., UPCROFT, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Eur J Biochem**, 1:155-61, 1996a.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 20: 211-20, 1996b.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 72: 47-56, 1995.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 61: 155-8, 1993.

BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, 125: 11-9, 2002.

BUSATTI, H.G., GOMES, M.A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, 101: 819-21, 2007.

CACOPARDO, B., PATAMIA, I., BONACCORSO, V., DI PAOLA, O., BONFORTE, S., BRANCATI, G. Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole-resistant giardiasis **Clin Ter**, 146: 761-7, 1995.

CADENAS, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. **J Biolumin Chemilumin**, 4: 208-18, 1989.

CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Freqüência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Bras. Soc. Med. Trop**, 28: 25-31, 1995.

CARRANZA, P.G., FELTES, G., ROPOLO, A., QUINTANA, S.M., TOUZ, M.C., LUJÁN, H.D. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. **Infect Immun**, 70: 5265-8, 2002.

CHICK, J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. **Drug Saf**, 20: 427-35, 1999.

CHIEN, C.T., SHYUE, S.K., LAI, M.K. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. **Transplantation**, 15: 1183-90, 2007.

CIMERMAN, B., CURY, F.M., MORENO, C.T. Avaliação terapêutica do secnidazol dose única no tratamento da giardíase em crianças. **Pediatr. Mod**, 6: 1008-1012, 1994.

COBBY, J., MAYERSOHN, M., SELLIAH, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, 202: 724-31, 1977.

CRUZ, C.C., FERRARI, L., SOGAYAR, R. A therapeutic trial in *Giardia muris* infection in the mouse with metronidazole, tinidazole, secnidazole and furazolidone **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 223-8, 1997.

DA COSTA-MACEDO, L.M., MACHADO-SILVA, J.R., RODRIGUES-SILVA, R., OLIVEIRA, L.M., VIANNA, M.S. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum communities of the city of Rio de Janeiro, Brazil **Cad Saude Publica**, 14: 851-5, 1998.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIN, J., LECLAIRE, C. Treatment of giardiasis (lambliasis) with metronidazole. Apropos of 100 cases. **Presse Med**, 6: 15-6, 1962.

DEHARO, E., BARKAN, D., KRUGLIAK, M., GOLENSER, J., GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. **Biochem Pharmacol**, 1: 809-17, 2003.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, 45: 2471-6, 1986.

- DUREL, P., ROIRON, V., SIBOULET, A., BOREL, L.J. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. **Br J Vener Dis**, 36: 21-6, 1960.
- ECKMANN, L., LAURENT, F., LANGFORD, T.D., HETSKO, M.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F., GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol**, 1: 1478-87, 2000.
- EDWARDS, D.L., FINK, P.C., VAN DYKE, P.O. Disulfiram-like reaction associated with intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole and metronidazole. **Clin Pharm**, 5: 999-1000, 1986.
- ELLIS, J.E., WINGFIELD, J.M., COLE, D., BOREHAM, P.F., LLOYD, D. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 23: 35-9, 1993.
- EMMERLICH, V., SCHOLZE, H., GILLIN, F.D., BAKKER-GRUNWALD, T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 87: 112-5, 2001.
- EMMERLICH, V., SANTARIUS, U., BAKKER-GRUNWALD, T., SCHOLZE, H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 131-4, 1999.
- ENEANYA, D.I., BIANCHINE, J.R., DURAN, D.O., ANDRESEN, B.D. The actions of metabolic fate of disulfiram. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 21: 575-96, 1981.
- ERTAN, P., YERELI, K., KURT, O., BALCIOĞLU, I.C., ONAĞ, A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. **Pediatr Int**, 44: 286-8, 2002.
- ESCOBEDO, A.A., CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother**, 8: 1885-902, 2007.
- FAIRLAMB, A.H. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. **Parasitology**, Suppl: 93-112, 1989.
- FARTHING MJ. Giardiasis. **Gastroenterol Clin North Am**, 25: 493-515, 1996.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev**, 13: 35-54, 2000.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J Parasitol**, 77: 441-8, 1991.
- FEELY, D.E., DYER, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. **J Protozool**, 34: 80-3, 1987.

FEITOSA, G., BANDEIRA, A.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R., BRITES, C. High prevalence of giardiasis and stronglyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, 5: 339-44, 2001.

FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev Assoc Med Bras**, 43: 61-8, 1997.

FINEGOLD, S.M. Metronidazole. **Ann Intern Med**, 93: 585-7, 1980.

FERNANDES, P.D., ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz J Med Biol Res**, 30: 93-9, 1997.

FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54: 679-708, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**, 15: 7761-4, 1989.

FULLER, R.K., GORDIS, E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? **Addiction**, 99: 21-4, 2004.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, 14: 114-28, 2001.

GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J., WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther**, 266: 23-32, 1993.

GASCÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, 73: 102-8, 2006.

GESSNER, T., JAKUBOWSKI, M. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester. A metabolite of disulfiram. **Biochem Pharmacol**, 15: 219-30, 1972.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., MCCAFFERY, J.M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679-705, 1996.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. **Infect Immun**, 56: 705-7, 1988.

GILLIS, J.C., WISEMAN, L.R. Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, 51: 621-38, 1996.

GIULIVI, C., TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 30: 243-51, 1988.

GU, F., CRUMP, C.M., THOMAS, G. Trans-Golgi network sorting. **Cell Mol Life Sci**, 58: 1067-84, 2001.

GUERRANT, R.L., KIRCHHOFF, L.V., SHIELDS, D.S., NATIONS, M.K., LESLIE, J., DE SOUSA, M.A., ARAUJO, J.G., CORREIA, L.L., SAUER, K.T., MCCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J Infect Dis**, 148: 986-97, 1983.

GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.T.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop**, 37: 501-06, 1995.

GUZIK, T.J., OLSZANECKI, R., SADOWSKI, J., KAPELAK, B., RUDZIŃSKI, P., JOPEK, A., KAWCZYŃSKA, A., RYSZAWA, N., LOSTER, J., JAWIEN, J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., CHANNON, K.M., KORBUT, R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. **J Physiol Pharmacol**, 56: 313-23, 2005.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*-current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res**, 88: 591, 2002.

HARRIS, J.C., PLUMMER, S., LLOYD, D. Antigiardial drugs. **Appl Microbiol Biotechnol**, 57: 614-9, 2001.

HALL, A.; NAHAR, Q. Albendazole as a treatment for infectious with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 87: 84-6, 1993.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.

HILL, B.G., HABERZETTL, P., AHMED, Y., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth muscle cell. **Biochem J**, 3, 2007.

HILL, D.R. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infect. Dis. Clin. N. A**, 7: 503-25, 1993.

HILL GASTON, J.S., LILICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 17: 219-39, 2003.

HU, P., JIN, L., BAILLIE, T.A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. **J Pharmacol Exp Ther**, 281: 611-7, 1997.

ISAAC-RENTON, J., MOOREHEAD, W., ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. **Appl. Environ. Microbiol**, 62: 47-54, 1996.

ISAAC-RENTON, J.L., CORDEIRO, C., SARAFIS, K., SHAHRIARI, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. **J Infect Dis**, 167: 431-40, 1993.

JARROLL, E.L., SENER, K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. **Drug Resist Updat**, 6: 239-46, 2003.

JIN, L., DAVIS, M.R., HU, P., BAILLIE, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. **Chem Res Toxicol**, 7: 526-33, 1994.

JOHANSSON, B., PETERSEN, E.N., ARNOLD, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethylthiocarbamic acid methyl ester. **Biochem Pharmacol**, 38: 1053-9, 1989.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404, 1982.

JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. **J Infect Dis**, 140: 984-8, 1979.

KATIYAR, S.K., GORDON, V.R., MCLAUGHLIN, G.L., EDLIND, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, 38: 2086-90, 1994.

KATTENBACH, W.M., PIMENTA, P.F., DE SOUZA, W., PINTO DA SILVA, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res**, 77: 651-8, 1991.

KAVOUSHI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, 28: 19-23, 1979.

KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 77: 487-88, 1983.

Krulewitch, C.J. An unexpected adverse drug effect. **J Midwifery Womens Health**, 48: 67-8, 2003.

KUŹMICKI, R., JESKE, J. Observations of the efficacy of ornidazole (Tiberall La Roche) in treatment of giardiasis. **Wiad Parazytol**, 40: 65-8, 1994.

LANFREDI-RANGEL, A., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 85: 951-5, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A., KATTENBACH, W.M., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 245-51, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH, W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol**, 123: 225-35, 1998.

LEITSCH, D., KOLARICH, D., WILSON, I.B., ALTMANN, F., DUCHÊNE, M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol**, 5: 211, 2007.

LEMÉE, V., ZAHARIA, I., NEVEZ, G., RABODONIRINA, M., BRASSEUR, P., BALLET, J.J., FAVENNEC, L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **J Antimicrob Chemother**, 46: 819-21, 2000.

LEVI, G.C., DE AVILA, C.A., NETO, V.A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 19: 422-4, 1977.

LI, L., WANG, C.C. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Mol Microbiol**, 59: 202-11, 2006.

LILL, R., KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, 25: 352-6, 2000.

LILL, J.S., MAYS, D.C., LIPSKY, J.J. S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. **Xenobiotica**, 26: 1025-33, 1996.

LINDMARK, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. **Exp Parasitol**, 65: 141-7, 1988.

LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 10: 476-82, 1976.

LINSTEAD, D.J., BRADLEY, S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 125-33, 1988.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., MITCHELL, A., HUGHES, M.N., WADLEY, R.B., EDWARDS, M.R. Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **J Appl Microbiol**, 5: 576-83, 2003.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., WADLEY, R., RALPHS, J.R., HANN, A.C., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. **Microbiology**, 148: 1349-54, 2002.

LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., BIAGINI, G.A., WADLEY, R.B., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, 146 12: 3109-18, 2000.

LO, H., REEVES, R.E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 2: 23-30, 1980.

LOEWENSON, R., MASON, P.R., PATTERSON, B.A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. **Ann Trop Paediatr**, 6: 73-8, 1986.

LOO, T.W., CLARKE, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. **J Natl Cancer Inst**, 7: 898-902, 2000.

LÓPEZ NIGRO, M.M., PALERMO, A.M., MUDRY, M.D., CARBALLO, M.A. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. **Toxicol In Vitro**, 17: 35-40, 2003.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61: 294-304, 1997.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., BYRD, L.G., NASH, T.E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 23: 7628-33, 1996.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem**, 8: 29307-13, 1995a.

LUJÁN, H.D., MAROTTA, A., MOWATT, M.R., SCIAKY, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., NASH, T.E. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**, 3: 4612-8, 1995b.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., WU, J.J., LU, Y., LEES, A., CHANCE, M.R., NASH, T.E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. **J Biol Chem**, 9: 13807-13, 1995c.

LUJÁN, H.D., NASH, T.E. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. **J Eukaryot Microbiol**, 41: 169-75, 1994.

MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 161-4, 1998.

- MACHADO, R.C., MARCARI, E.L., DE FÁTIMA, S., CRISTANTE, V., CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíase em crianças de crèches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Brás. Méd. Trop**, 32: 697-704, 1999.
- MADAN, A., PARKINSON, A., FAIMAN, M.D. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. **Drug Metab Dispos**, 23:1153-62, 1995.
- MAJID, D.S., NISHIYAMA, A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. **Hypertension**, 39: 293-7, 2002.
- MALMSTRÖM, B.G. Enzymology of oxygen. **Annu Rev Biochem**, 51: 21-59, 1982.
- MEHLOTRA, R.K., TEKWANI, B.L. Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Microbes Infect**, 1: 385-94, 1999.
- MORGAN, U.M., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 328-31, 1993.
- MÜLLER, N., VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**, 35: 1339-47, 2005.
- MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem Pharmacol**, 1; 35: 37-41, 1986.
- MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, 93: 165-71, 1983.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I., QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, 35: 133-41, 2002.
- NASH, T.E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 45: 585-90, 2002.
- NASH, T., RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1488-92, 1998.
- NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop Med Int Health**, 6: 624-34, 2001.
- OBERHUBER, G., VOGELSANG, H., STOLTE, M., MUTHENTHALER, S., KUMMER, A.J., RADASZKIEWICZ, T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. **Am J Pathol**, 148: 1351-7, 1996.

OLNESS, K. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. **J Dev Behav Pediatr**, 24: 120-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Foodborne Diseases**, 2002. <disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em out, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The World Health Report**, Geneva, 1996

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R.P., DURLACHER, R., DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 621-5, 2001.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin Infect Dis**, 25: 545-9, 1997.

PAGET, T.A., RAYNOR, M.H., SHIPP, D.W., LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 63-7,

PAGET, T.A., JARROLL, E.L., MANNING, P., LINDMARK, D.G., LLOYD, D. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol**, 135: 145-54, 1989.

PILON-SMITS, E.A., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T., PILON, M. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. **Plant Physiol**, 130: 1309-18, 2002.

PIMENTEL, D., COOPERSTEIN, S., RANDELL, H., FILIBERTO, D., SORRENTINO, S., KAYE, B., NICKLIN, C., YAGI, J., BRIAN, J., O'HERN, J., HABAS A., WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, 35: 653-668, 2007.

PRITSOS, C.A., KEYES, S.R., SARTORELLI, A.C. Effect of the superoxide dismutase inhibitor, diethyldithiocarbamate, on the cytotoxicity of mitomycin antibiotics. **Cancer Biochem Biophys**, 10: 289-98, 1989.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, 90: 19-39, 2003.

RAIPULIS, J., TOMA, M.M., SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **Int J Food Microbiol**, 25: 343-7, 2005.

REIN, A., OTT, D.E., MIRRO, J., ARTHUR, L.O., RICE, W.G., HENDERSON, L.E. Suppression of retroviral replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. **Leukemia**, 11: 106-8, 1997.

REINER, D.S., MCCAFFERY, M., GILLIN, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol**, 53: 142-53, 1990.

RIVAS, L., MURZA, A., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Interaction of anti-malarial drug quinacrine with nucleic acids of variable sequence studied by spectroscopic methods. **J Biomol Struct Dyn**, 18: 371-83, 2000.

ROE, F.J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surgery**, 93: 158-64, 1983.

SAMARAWICKREMA, N.A., BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., THAMMAPALERD, N., UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother**, 40: 833-40, 1997.

SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 43: 1533-41, 1999.

SAUNA, Z.E., SHUKLA, S., AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol Biosyst**, 1: 127-34, 2005.

SAUNA, Z.E., NANDIGAMA, K., AMBUDKAR, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. **J Biol Chem**, 19: 48855-64, 2004.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, 22: 203-8, 2006.

SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, 4: 1749-60, 2007.

SCHMIDT, H.L., STÖCKLEIN, W., DANZER, J., KIRCH, P., LIMBACH, B. Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. **Eur J Biochem**, 1: 149-55, 1986.

SCULLY, B.E. Metronidazole. **Méd. Clin. North Am**, 72: 613-21, 1988.

SHINTANI, T., KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, 5: 990-5, 2004.

SLAVIN, I., SAURA, A., CARRANZA, P.G., TOUZ, M.C., NORES, M.J., LUJÁN, H.D. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 122: 95-8, 2002.

SMITH, N.C., BRYANT, C., BOREHAM, P.F. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 18: 991-7, 1988.

STANTON, T.B., JENSEN, N.S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **J Bacteriol**, 175: 2980-7, 1993.

STOCKIS, A., DE BRUYN, S., GENGLER, C., ROSILLON, D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 40: 221-7, 2002.

STROMME, J.H. Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. **Biochem Pharmacol**, 12: 705-15, 1963.

SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., DELGADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MÜLLER, M., TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13: 10368-73, 2004.

SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 22: 2156-61, 2007.

SVÄRD, S.G., MENG, T.C., HETSKO, M.L., MCCAFFERY, J.M., GILLIN, F.D. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 30: 979-89, 1998.

TACHEZY, J., SÁNCHEZ, L.B., MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol Biol Evol**, 18: 1919-28, 2001.

TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.

TÉLLEZ, A., PALM, D., WEILAND, M., ALEMÁN, J., WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E., SVÄRD, S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. **Parasite Immunol**, 27: 163-9, 2005.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**, 9: 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, 32: 493-6, 2002.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infections disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol**, 30: 1259-1267, 2000.

THOMPSON, S.C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J Paediatr Child Health**, 30: 202-9, 1994.

THOMPSON, R.C.A, REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, 32: 71-160, 1993.

TONKIN, E.G., VALENTINE, H.L., ZIMMERMAN, L.J., VALENTINE, W.M. Parenteral N,N-diethylthiocarbamate produces segmental demyelination in the rat that is not dependent on cysteine carbamylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1: 139-50, 2003.

TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, 56: 173-94, 1994.

UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, 14: 150-64, 2001a.

UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Ant. Ag. Chemoth**, 45: 1810-14, 2001b.

UPCROFT, P., EDWARDS, R.M., UPCROFT, J.A., BROWN, D.M. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

UPCROFT, J., UPCROFT, P. My favorite cell: *Giardia*. **Bioessays**, 20: 256-63, 1998.

UPCROFT, J.A., CAMPBELL, R.W., UPCROFT, P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. **Parasitology**, 112: 309-13, 1996.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol Today**, 9: 187-90, 1993.

UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., BOREHAM, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 20: 489-96, 1990.

VON ALLMEN, N., BIENZ, M., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Experimental infections of neonatal mice with cysts of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. **Infect Immun**, 72: 4763-71, 2004.

WASSMANN, C., HELLBERG, A., TANNICH, E., BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **J Biol Chem**, 10: 26051-6, 1999.

WEBSTER, B.H. Furazolidone in the treatment of giardiasis. **Am J Dig Dis**, 5: 618-22, 1960.

WEINBACH, E.C., CLAGGETT, C.E., KEISTER, D.B., DIAMOND, L.S., KON, H. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. **J Parasitol**, 66: 347-50, 1980.

WOLFE, M.S. Giardiasis. **N Engl J Med**, 9: 319-21, 1978.

VOOGD, C.E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, 86: 243-77, 1981.

WOO, P., PANAYI, G.S. Reactive arthritis due to infestation with *Giardia lamblia*. **J Rheumatol**, 11: 719, 1984.

WOOD, Z.A., SCHRODER, E. ROBIN HARRIS, J., POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, 28: 32-40, 2003.

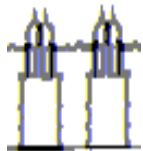
WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, 2: 529-41, 2003.

WRIGHT, C. 4TH., VAFIER, J.A., LAKE, C.R. Disulfiram-induced fulminating hepatitis: guidelines for liver-panel monitoring. **J Clin Psychiatry**, 49: 430-4, 1988.

XIE, Z., KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9: 1102-9, 2007.

YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 281: 30299-304, 2006.

ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop Med Int Health**, 2: 63-82, 1997.



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção
do grau de Mestre.

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A599e Anjos, Karla Graziela Santana dos
Efeitos do dietilditiocarbamato em trofozoítos de *giardia lamblia*: uma nova
ferramenta na terapia contra a giardíase [manuscrito] / Karla Graziela Santana dos. -
2008.
59 f. : il. ; 30 cm.
Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório de Biomorfologia
Parasitária.

1. *Giardia Lamblia*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dietilditiocarbamato. T. I. Título.

CDU 616.995.132:615.32

AGRADECIMENTOS

Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Adriana Lanfredi Rangel

Primeiramente, pela amizade. Sua orientação na bancada foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho. Meu carinho por você é do tamanho do seu coração.

Msc. Cláudio Pereira Figueira

Pela amizade, incentivo e por muitas vezes me ajudar na hora do “sufoco”.

Glória Maria Maranhão Sweet

Por me acolher como uma mãe durante a realização deste trabalho. Sei que seremos eternas amigas!

Msc. Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Brandão

Pela amizade, companheirismo e apoio dado nos momentos difíceis.

Msc. Rafael Gomes, Diego Menezes e Alene Vanessa

Pelas discussões sobre estresse oxidativo e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Elizabeth Mota Costa

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

Elisângela Sodré

Pela amizade e excelente convivência.

Síntia Sacramento, Gustavo Miranda, Antônio Fávero e Edgard Neto

Aos giardólogos e amebólogos, pelo companheirismo e apoio durante todo este tempo na bancada.

Ana Lúcia Costa, Angélica Lacerda, Danielle Anjos, Daniel de Abreu Silva, Rafael Costa,

Thiara Monteiro, Samanta Alexandrino, Fernanda Bomfim e Lourdes Neta

Pela ótima convivência no laboratório.

Msc. Mateus Santos de Sá

Pelo apoio com o experimento de citotoxicidade em linfócitos.

Dr. Jorge Clarêncio

Pelo apoio dado na citometria de fluxo.

Taise Coutinho Caíres

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo suporte dado nas pesquisas.

Todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

Todos os professores e colegas do Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa de 2006

Pelos ensinamentos e amizade.

Todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Minha família (Carlos, Luiza e Vinícius) e meu noivo (Ricardo)

Por vocês existirem! Amo vocês, por inteiro!

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

Aquilo que todos os dias seria limite para nós é destinado a se tornar grande como o olhar de Nossa Senhora. Maria entendia que o conteúdo de cada condição humana desenvolve e realiza o desígnio de um Outro: não o desígnio do próprio coração, mas o do coração de Deus.

As dores, assim como a vida, certamente não lhes faltarão, mas vocês viverão a vida como um caminho; mesmo quando o caminho for fatigante, será a descoberta de um bem realmente grande.

Luigi Giussani

RESUMO

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, onde é exposto a diferentes concentrações de oxigênio. Apesar do metabolismo fermentativo, trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio e mecanismos de detoxificação são requeridos. Desprovido de glutatona, *Giardia* expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína (CRP, também conhecidas como proteínas variantes de superfície ou VSP), como defesa antioxidante. Este mecanismo envolve ciclagem redox para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido e proteção contra o estresse oxidativo. Neste contexto, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem compreender uma poderosa estratégia quimioterápica contra a giardíase. Neste estudo, nós analisamos os efeitos do dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor de superóxido dismutase (SOD), na proliferação do parasito, expressão de tióis totais, lipoperoxidação, produção de radicais livres e arquitetura celular. DETC inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao metronidazol e induziu a peroxidação de membranas neste parasito, possivelmente pelo aumento de espécies reativas. Alterações ultraestruturais também foram observadas neste protozoário. Células tratadas com DETC apresentaram alto grau de extração citoplasmática, além de estruturas indicativas de autofagia. As vesículas periféricas também se encontravam maiores, sugerindo confluência. Estes efeitos são independentes de SOD, já que *Giardia* não apresenta esta enzima. Detecção de grupos tiol com a sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA) foram significativamente moduladas negativamente pelo DETC. Estes dados nos indicam que DETC aumenta o estresse oxidativo em trofozoítos de *Giardia lamblia* pela reação com grupos tiol.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, dietilditiocarbamato, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The microaerophilic protozoan *Giardia lamblia* inhabits the upper small intestine mucosa of vertebrate hosts, where it is exposed to different concentrations of oxygen. Despite the fermentative metabolism, *Giardia* trophozoites consume O₂ and produce oxygen free radicals and therefore mechanisms for detoxification are required. Devoid of glutathione, *Giardia* express high concentrations of cysteine-rich proteins (CRP, also known as variable surface protein or VSP), as an antioxidant defense. This mechanism involves redox cycling for maintenance of a reduced intracellular environment and protection from oxidative stress. In this regard, substances that interfere in the antioxidant response of this protozoan could comprise a powerful chemotherapeutic strategy for *Giardia lamblia* infection. Here, we analyzed the effects of DETC, a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, on parasite proliferation, thiol expression, lipid peroxidation, free radicals detection and cell architecture. DETC inhibited parasite proliferation at levels similar to metronidazole and induced peroxidation of membrane, possibly by the increase of reactive species. Ultrastructural alterations were also observed. Since this protozoan is devoid of SOD, here present data indicate SOD-independent DETC effects. Thiol groups detection with the fluorescent probe *o*-phthalaldehyde (OPA). Cells treated with DETC displayed washed out cytoplasm and structures indicative of autophagy. The peripheral vesicles also had an increased volume, presumably caused by homophilic fusion. Taken together these data indicate that DETC enhance the oxidative stress in *Giardia* trophozoites by reacting with thiol groups.

Keywords: Giardia lamblia, diethyldithiocarbamate, oxidative stress.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	05
Figura 2	Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	06
Figura 3	Trofozoíto de <i>Giardia</i> em seção transversal.....	09
Figura 4	Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.....	24
Figura 5	Avaliação do possível sinérgico do DETC e metronidazol em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	25
Figura 6	Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.....	27
Figura 7	Análise da expressão de tióis livres em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8	Quantificação dos grupos sulfidríla em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Figura 9	Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia</i> em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 10	Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	32
Figura 11	Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 12	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	36
Figura 13	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> tratados com DETC.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Ceará
CO ₂	Dióxido de carbono
CRPs	Proteínas ricas em cisteína
Cu	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT-diaforase	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
DTNB	5,5'- ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico)
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ DCFDA	5'- (6')- carboxi, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulina A
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Me	Grupamento metil
Mtz	Metronidazol
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
S	Enxofre
SH	Grupo sulfidrila
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SOD	Superóxido dismutase
SP	São Paulo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VSPs	Proteínas variantes de superfície
<i>Zn</i>	<i>Zinco</i>

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A giardíase.....	01
1.2. A giardíase no Brasil.....	02
1.3. Ciclo biológico.....	03
1.4. O trofozoíto.....	07
1.5. Mecanismos de detoxificação de espécies reativas em <i>Giardia</i>	10
1.6. Tratamento da giardíase.....	11
1.6.1. Nitroimidazóis.....	11
1.6.2. Quinacrina.....	13
1.6.3. Furazolidona.....	14
1.6.4. Benzimidazóis.....	14
1.6.5. Paromicina.....	15
1.6.6. Nitazoxanida.....	15
1.6.7. Bacitracina complexada a sais de zinco.....	16
1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas.....	16
1.7. Dissulfiram: novos potenciais terapêuticos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo Geral.....	19

3.2. Objetivos Específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	20
4.3. Ensaio de inibição.....	20
4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	20
4.5. Detecção de tióis totais.....	21
4.6. Lipoperoxidação.....	21
4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas.....	21
4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol.....	22
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	22
4.10. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	23
5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	25
5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i>	26
5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	28
5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31
5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC.....	35

6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	45
8. BIBLIOGRAFIA.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GIARDÍASE

A Giardíase é uma enteroparasitose causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Espécies deste gênero infestam mais de 40 espécies de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2002; Appelbee *et al.*, 2005), que podem agir como reservatório para cepas patogênicas em humanos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma cística infectante que pode sobreviver no ambiente por meses e a trofozoíta, que prolifera intensamente na porção anterior do intestino (Adam, 2001). As manifestações clínicas da doença são diarreia aguda ou crônica (eventualmente esteatorréia), desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller & Von Allmen, 2005; Gascón, 2006). Artrite reativa também tem sido associada com infestações entéricas por *Giardia lamblia* (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), bem como o status nutricional afetando função cognitiva e desenvolvimento escolar em crianças pela prevalência de doenças infecciosas intestinais (Olness, 2003).

A distribuição da giardíase é mundial, sendo a parasitose intestinal mais comum em países desenvolvidos, com taxas de detecção entre 2-5% e, 20-30% em nações em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 1996 que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tinham sintomas de giardíase com cerca de 500.000 novos casos por ano, especialmente entre crianças. Em 2004, a giardíase foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido a sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarreicas (OMS, 2002).

Atualmente as infecções por *G. lamblia* são controladas por drogas, sendo as mais efetivas as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 1998). Casos de resistência clínica são relatados na literatura (Townson, 1994; Farthing, 1996), com taxas de recorrência acima de 90% (Zaat *et al.*, 1997). Além disso, o metronidazol exibe potencial carcinogênico para humanos (Bendesky *et al.*, 2002). Desta forma, a identificação de novas vias parasito-específicas e desenvolvimento de novas drogas é necessário para o tratamento da giardíase.

No lúmen intestinal do hospedeiro vertebrado, *Giardia* é exposta a diferentes concentrações de oxigênio (Biagini *et al.*, 2001). Apesar do metabolismo fermentativo, *Giardia* consome O₂, produzindo radicais livres de oxigênio e a resposta imune também pode usar espécies oxidativas (Fernandes & Assreuy, 1997). Desta forma, mecanismos de detoxificação são requeridos (Brown *et al.*, 1995). Trofozoítos de *Giardia* são cobertos por proteínas ricas em cisteína (CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície), envolvidas na proteção do parasito contra os efeitos letais do oxigênio (Mehlotra & Tekwani, 1999). Além disso, estas proteínas estão associadas à resistência a proteases e à variação antigênica, sendo identificados cerca de 150 genes diferentes que codificam para as CRPs em *G. lamblia* (Nash, 2002). A enzima dissulfeto redutase está presente em *Giardia*, conferindo um balanço redox dissulfeto intracelular, ressaltando a importância da cisteína neste parasito na resposta ao estresse oxidativo. A cisteína é descrita como um fator de crescimento essencial para a *Giardia*, o que pode ser verificado no cultivo axênico (Luján & Nash, 1994; Mehlotra & Tekwani, 1999). Nesse sentido, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem constituir uma poderosa estratégia quimioterápica no parasitismo por *Giardia lamblia*.

1.2. A GIARDÍASE NO BRASIL

No Brasil, sua ocorrência é em grande parte desconhecida - principalmente em adultos. Prevalências relatadas de giardíase em crianças brasileiras variam de 14,6% em populações específicas a 78,3% em creches e crianças em idade escolar (Machado & Costa-Cruz, 1998; da Costa-Macedo *et al.*, 1998; Orlandi *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo sobre a giardíase foi realizado em Gonçalves Dias no município de Fortaleza (CE), acompanhando crianças recém-nascidas até os 4 anos de idade (Newman *et al.*, 2001). Dentre as 157 crianças, 43 (27,4%) encontravam-se infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 46% apresentaram recorrências ou recidivas. As crianças que apresentavam sintomas tiveram valores reduzidos de peso e altura, quando avaliados física e nutricionalmente.

No Hospital da Universidade Federal da Bahia, foi realizado um estudo detalhado sobre a prevalência de parasitos intestinais em 365 pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Cerca de 4,9% destes pacientes apresentaram infestação por *Giardia lamblia*, demonstrando uma prevalência significativamente aumentada quando comparada ao grupo que

não apresentava a SIDA (2,4%). O grupo controle foi composto por 5243 pacientes (Feitosa *et al.*, 2001).

Machado *et al.* (1999), em um estudo sobre a incidência de giardíase em crianças de creches e escolas de ensino fundamental e médio, no município de Mirassol (SP), confirmam os dados obtidos por outros autores (Wolfe, 1978; Cardoso *et al.*, 1995; Guimarães & Sogayar, 1995) que tanto a idade (2 a 6 anos) quanto o nível sócio-econômico (até 6 salários mínimos) são fatores de risco determinantes da giardíase. Isto se dá pelo fato do nível sócio-econômico e grau de escolaridade mais baixos influenciarem as condições de higiene pessoal e cuidados com alimentos e água (Machado *et al.*, 1999). Um estudo prospectivo de doenças diarréicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para aquisição de giardíase (Guerrant *et al.*, 1983).

Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) demonstraram haver associação entre má nutrição (desnutrição energético-protéica) e o parasitismo por *Giardia lamblia* através da observação de redução significativa dos valores de peso em relação à idade e altura. Outros estudos demonstraram a relação entre infestações por *Giardia* e subnutrição na África (Loewenson *et al.*, 1986) e Ásia (Al-mekhlafi *et al.*, 2005). Ertan *et al.* (2002) também encontraram associação entre baixos níveis séricos de ferro e zinco e a giardíase.

O decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasito (Wolfe, 1978; Hill, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1999) e também com a melhoria dos hábitos de higiene pessoal associada ao aumento da idade.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

A infestação por *Giardia* ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados por fezes contendo cistos (Fig. 1), como ocorre freqüentemente em creches e orfanatos onde as condições de higiene podem estar comprometidas (Thompson, 2004). O excistamento ocorre no trato digestório, auxiliado pelo baixo pH e proteases estomacais (Adam, 2001), dando origem ao excizoíto (Bernander *et al.*, 2001). O excizoíto é oval, possui oito flagelos, quatro núcleos e metabolismo intermediário entre o trofozoíto e o cisto (Fig. 2). Possui uma ploidia total de 16N, sofrendo divisão celular por duas vezes sem replicação do DNA,

gerando quatro trofozoítos com uma ploidia de 4N (Bernander *et al.*, 2001). Estes últimos irão se dividir por fissão binária e a adesão ao epitélio intestinal se dá através do disco ventral (Elmendorf *et al.*, 2003).

O encistamento ocorre com a passagem dos trofozoítos pelo lúmen intestinal, onde eles se soltam e são expostos na região posterior do intestino a um pH mais alcalino (em torno de 7,8), ácidos graxos e sais biliares (Gillin *et al.*, 1988). A ausência de lipoproteínas também demonstrou ser um fator de promoção do encistamento, o que pôde ser revertido pela adição de colesterol (Luján *et al.*, 1996).

O processo de formação da parede cística envolve a ativação dos genes de encistamento em resposta a estímulos e posterior síntese de proteínas que constituirão a parede cística (Lujan *et al.*, 1995a; 1997), as quais são transportadas para a membrana plasmática através das vesículas específicas de encistamento (ESVs) (Reiner *et al.*, 1990; Benchimol, 2004). Durante o tráfego destas proteínas, é provável que haja a participação das vesículas periféricas na maturação do material a ser secretado (Touz *et al.*, 2002a).

O potencial zoonótico desta doença tem sido considerado na literatura como um fator de relevância na transmissão peridomiciliar de felídeos e canídeos (Thompson, 2000).

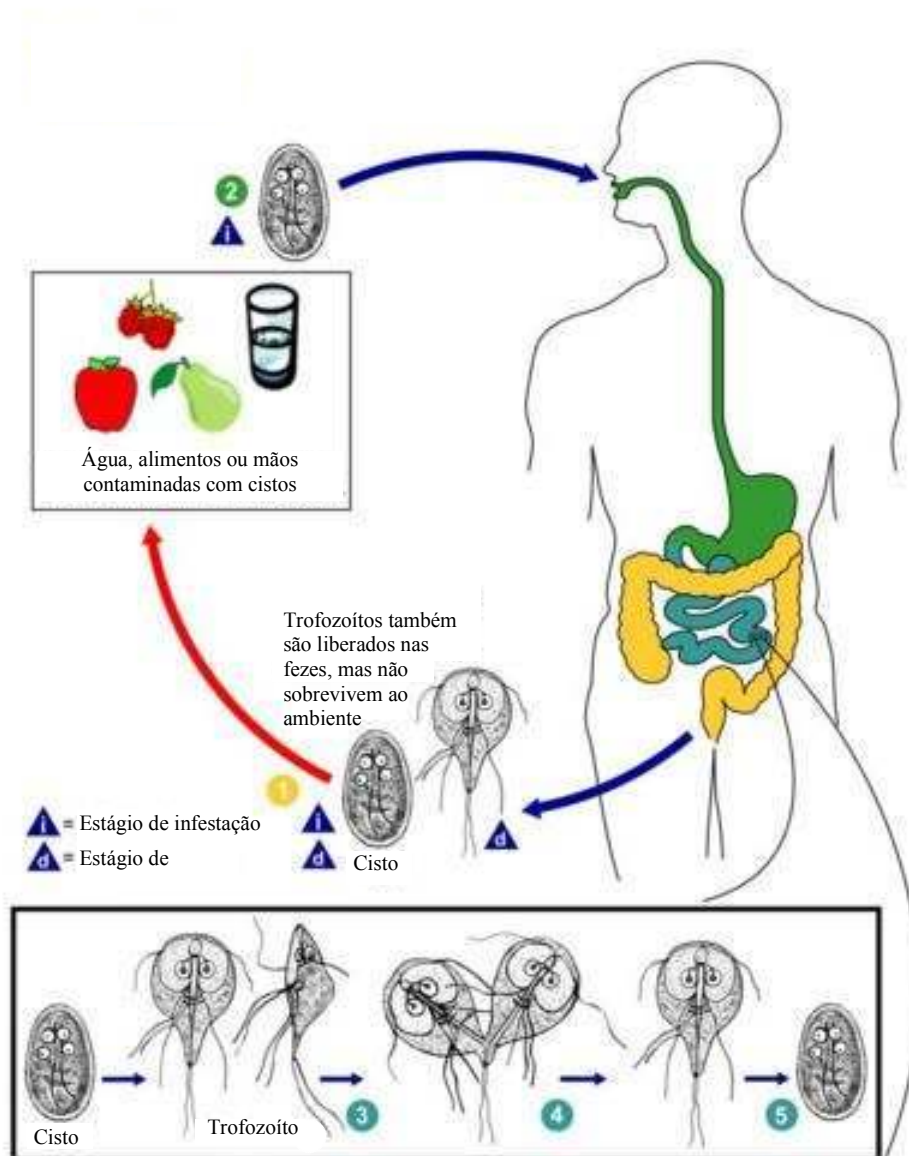


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Cistos e trofozoítos eliminados através das fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Trofozoítos em processo de divisão. (5) Encistamento. Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc-gif>.

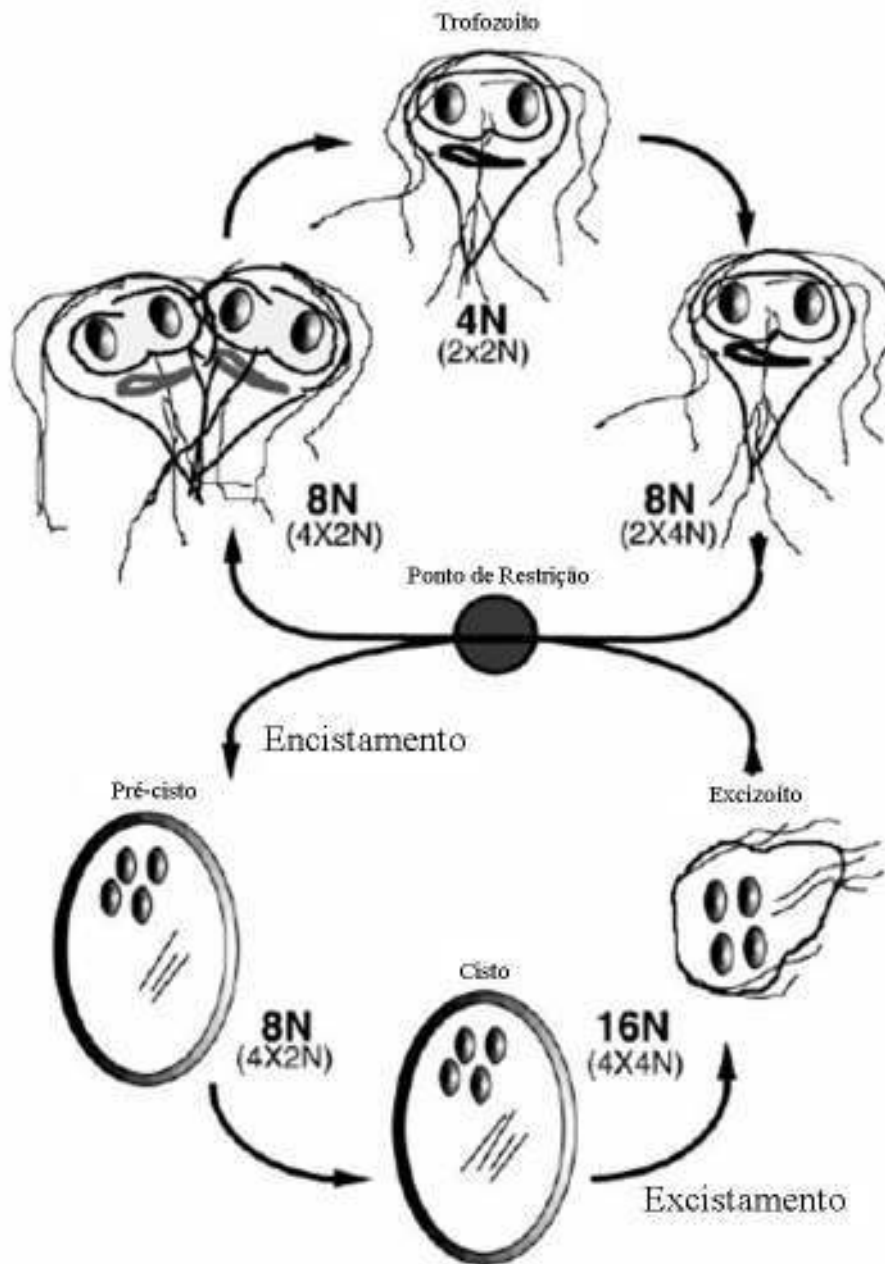


Figura 2. Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Durante o crescimento vegetativo, a ploidia varia entre 4N e 8N. Após a estimulação do encistamento e concomitante formação da parede cística, o núcleo se divide, resultando em uma célula tetranucleada com ploidia de 8N. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros, com uma ploidia celular de 16N. O excistamento resulta na liberação de um excizoíto, que se divide duas vezes para formar quatro trofozoítos, contendo cada um dois núcleos diplóides. Adaptado de Bernander *et al.*, 2001.

1.4. O TROFOZOÍTO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* são piriformes, possuindo cerca de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, látero-posterior, caudal e ventral), sendo que os axonemas caudais são acompanhados pelo corpo funis e um disco adesivo é responsável pela adesão do trofozoíto às microvilosidades intestinais (Fig.3). Possui dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente e simétricos ao eixo longitudinal (Revisto por Adam, 2001). Ribossomos e grânulos de glicogênio se apresentam por todo o citoplasma e o retículo endoplasmático se projeta da região perinuclear até a região das vesículas periféricas, na região dorsal da célula (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). O complexo de Golgi torna-se visível em trofozoítos em processo de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999), mas não tem sido confirmada a presença em trofozoítos vegetativos (Gillin *et al.*, 1996). Apesar disso, mecanismos de transporte de proteínas estão presentes em *Giardia*, semelhantes aos que ocorrem na rede *trans* do aparelho de Golgi na maioria das células complexas (Gu *et al.*, 2001). Algumas evidências sugerem que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar organela(s) com função típica de Golgi, apesar de não ter sua aparência. NBD-ceramida, um marcador do complexo de Golgi em células de mamíferos, marcou uma estrutura perinuclear tanto em trofozoítos vegetativos, quanto em células em processo de encistamento (Luján *et al.*, 1995b; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

As vesículas periféricas são caracterizadas pela acidez dos seus compartimentos, como demonstrado através da incorporação de laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), bem como pela concentração de ferritina exógena e lucifer yellow, sugerindo seu papel na endocitose (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Os vacúolos contêm uma variedade de enzimas com atividade hidrolásica, como por exemplo, a fosfatase ácida, proteases e RNase, indicando suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). É provável que ocorra maturação destes vacúolos de endossoma inicial, tardio até lisossomo, processo que pode estar funcionalmente associado ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Apesar de *Giardia* não possuir mitocôndria, a presença de membranas especializadas com função transportadora de elétrons tem sido detectada (Lloyd *et al.*, 2002). Conhecidas como mitossomos, estas organelas são responsáveis pela produção de H₂ e apresentam maquinaria protéica para biossíntese de centros Fe-S (Tachezy *et al.*, 2001). Em eucariotos, este processo ocorre exclusivamente em organelas limitadas por dupla membrana, como mitocôndria (Lill &

Kispal, 2000), hidrogenossomos (Sutak *et al.*, 2004) e cloroplastos (Pilon-Smits *et al.*, 2002). Peroxissomos, que são organelas citoplasmáticas responsáveis por reações oxidativas, estão ausentes neste parasito.

Os proteassomos de *Giardia* apresentam muitas similaridades com os de Archaea (Emmerlich *et al.*, 1999). Além disso, proteínas alvo de proteassomos são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar presente neste protozoário como um gene de cópia única, o que o distingue dos outros eucariotos, que possuem múltiplas cópias desse gene (Emmerlich *et al.*, 2001).

Cerca de 30% dos trofozoítos apresentam uma protrusão ventral que emerge da região central do disco adesivo. A observação desta estrutura revelou a presença de cisternas de retículo endoplasmático, muitas vezes formando membranas concêntricas envolvendo quantidades variadas de grânulos de glicogênio, possivelmente em processo de degradação, além de vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

A flange ventrolateral é uma projeção citoplasmática maleável, semelhante a lamelipódios, localizada entre as regiões de superfície ventral e dorsal e que se ajusta as microvilosidades das células epiteliais durante a adesão (revisto por Adam, 2001).

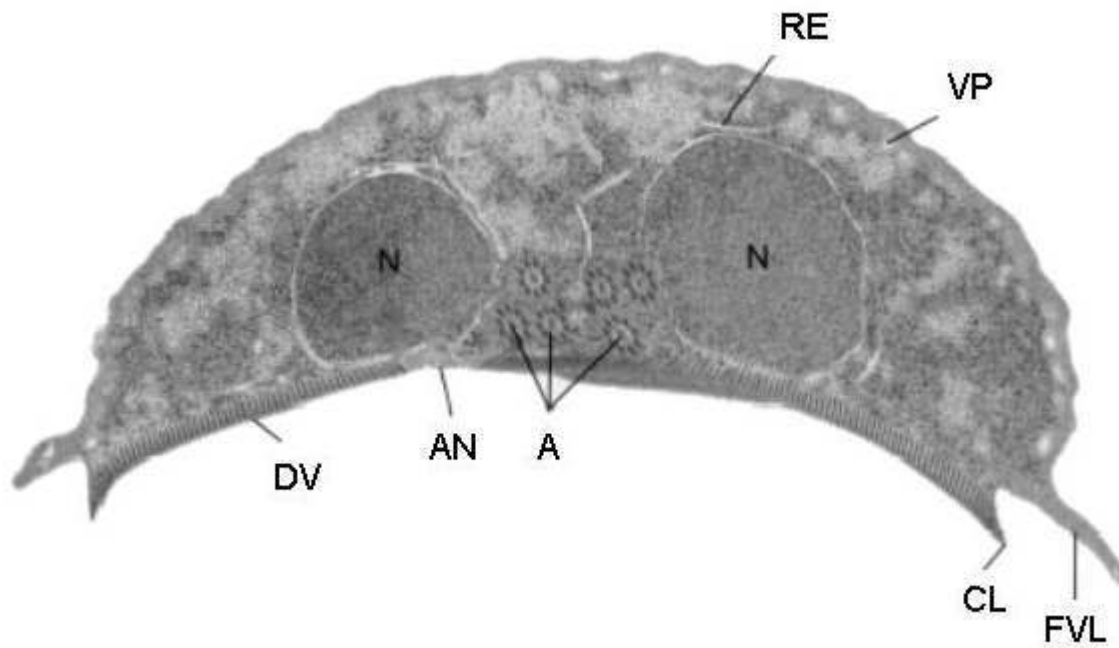


Figura 3. Trofozoíto de *Giardia* em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Adaptado de Adam, 2001.

1.5. MECANISMOS DE DETOXIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM *Giardia*

Apesar de não possuir mitocôndria, *Giardia* consome oxigênio e os produtos finais do seu metabolismo de glicose são sensíveis às tensões de O₂ presentes no lúmen intestinal. Em um ambiente anaeróbico, etanol, alanina e dióxido de carbono (CO₂) são formados em concentrações equimolares. Contudo, quando o oxigênio é introduzido, o balanço de carbono é radicalmente alterado. A produção de alanina é reduzida em cerca de 90% e a produção de acetato é simultaneamente aumentada em cerca de dez vezes. A concentração de CO₂ é aproximadamente duas vezes aumentada, mas a produção de etanol não é alterada (Paget *et al.*, 1990). A capacidade de respirar de alguns protozoários anaeróbicos sugere que eles são capazes de transferir elétrons ao oxigênio como seu aceptor final. Contudo, seu metabolismo permanece fermentativo, mesmo em condições aeróbicas. A utilização de O₂ por *Giardia lamblia* não é afetada por inibidores de respiração mitocondrial, mas bloqueada por flavo-antagonistas, inibidores de tiol e quelantes de metal (Weinbach *et al.*, 1980), sugerindo que algumas das flavoproteínas, tioproteínas e metaloproteínas podem usar O₂ como aceptor de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio neste parasito.

Os mecanismos de detoxificação de espécies oxidativas neste parasito incluem a atividade citoplasmática de uma oxidase flavina-dependente (NADH oxidase), que reduz tetravalentemente O₂ em H₂O, além de estar envolvida em mecanismos de resistência ao metronidazol de algumas cepas, que expressam altos níveis de atividade desta enzima (Ellis *et al.*, 1993). A susceptibilidade de *Giardia lamblia* ao oxigênio também é justificada pela presença da DT-diaforase, uma enzima que tem sua atividade acompanhada pelo aumento intracelular de peróxido de hidrogênio (Li & Wang, 2006). A NADH peroxidase, localizada na região transmembrana de *Giardia lamblia*, catalisa a formação de água a partir de peróxidos (Brown *et al.*, 1995).

Um importante mecanismo de proteção contra o ambiente hostil ao qual *Giardia* é submetido no intestino está relacionado a um ambiente redutor produzido pelas CRPs, que apresentam de 11 a 12% de cisteína e são expressas em *Giardia lamblia* em concentrações milimolares (Luján & Nash, 1994). A cisteína é o principal tiol de baixo peso molecular neste parasito, mas baixos níveis de sulfito, ácido tioglicólico e coenzima A também foram observados, enquanto que glutatona e seus intermediários não foram detectados (Brown *et al.*, 1993). Além disso, subsequente identificação de uma dissulfeto redutase (semelhante à tioredoxina redutase), que utiliza cistina como aceptor primário de elétrons em *Giardia*, parece ser o maior sistema de

atividade redox tiol-dissulfeto contra o estresse oxidativo neste protozoário (Brown *et al.*, 1996b). Pesquisas em dados de base genômicas em *G. lamblia* revelaram também homólogos de tioredoxinas peroxidases que, se expressadas, podem proteger organismos dos radicais livres de oxigênio pela redução de peróxidos com os elétrons da tioredoxina (Wood *et al.*, 2003).

Algumas das enzimas reconhecidamente envolvidas na detoxificação de radicais livres de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água pela catalase, não estão presentes em *Giardia*, sugerindo a importância dos grupamentos tiol na sobrevivência deste parasito (Brown *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Biagini e colaboradores (2001) descreveram o potencial antioxidante do piruvato em *Giardia*, transformando não enzimaticamente superóxido e peróxido de hidrogênio em acetato e CO₂.

Uma importante estratégia do parasito *G. lamblia* contra a defesa do hospedeiro durante a colonização da mucosa intestinal se dá através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase epitelial, por uma competição pela arginina, utilizada como fonte de energia pelo parasito. O NO apresenta propriedades citostáticas contra *Giardia* e o bloqueio de sua produção, conseqüentemente, permitirá a sua proliferação (Eckmann *et al.*, 2000).

Morte de trofozoítos de *Giardia lamblia* por macrófagos murinos ativados ocorreu rapidamente *in vitro* (Fernandes & Asseruy, 1997), com 60% dos parasitos sendo eliminados em cerca de 2 horas. Um inibidor de NO sintase, *N*-iminoetil-1-ornitina, protegeu os organismos. A extrema sensibilidade deste parasito ao estresse nitrosativo é principalmente devida à interrupção de funções da membrana plasmática, e perda da capacidade do consumo de O₂ em associação com a diminuição da atividade flagelar (Lloyd *et al.*, 2003).

1.6. TRATAMENTO DA GIARDÍASE

1.6.1. Nitroimidazóis

Os agentes da classe dos nitroimidazóis utilizados para tratamento de infecções por *Giardia* incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. O metronidazol foi primeiramente relatado para o tratamento da tricomoníase (Durel *et al.*, 1960), sendo

posteriormente indicado para uso terapêutico na giardíase (Darbon *et al.*, 1962). Desde então, a síntese e testes biológicos de outros compostos nitroimidazóis têm sido uma crescente, aumentando o arsenal terapêutico contra protozoários e bactérias anaeróbicas (Scully, 1988; Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 2001a; Harder, 2002). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (Raether & Hänel, 2003).

Dos nitroimidazóis, o mecanismo de ação do metronidazol tem sido o mais amplamente estudado. A ativação da droga se dá através da redução do seu grupo nitro pela piruvato: ferredoxina oxidoreductase (Townson *et al.*, 1994; Samuelson, 1999), e um gradiente favorecendo o transporte intracelular do metronidazol é estabelecido por esta reação de redução. A atividade antimicrobiana deste composto reduzido resulta da reatividade e dismutação de intermediários instáveis, que matam os trofozoítos através da interação com várias moléculas essenciais como o RNA, DNA, proteínas e componentes de membrana, resultando em danos celulares irreversíveis (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988; Freeman *et al.*, 1997). Além destes efeitos, o metronidazol inibe o consumo de O₂ do trofozoíto, por agir como um aceptor de elétrons alternativo (Paget *et al.*, 1989). Apesar de este composto ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, ele se mostra ineficaz contra os cistos, provavelmente pela dificuldade em ultrapassar a barreira imposta pela parede cística (Thompson *et al.*, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do metronidazol incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (Levi *et al.*, 1977; Kavousi, 1979). Além disso, a inibição da aldeído desidrogenase por esta droga pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), pela ingestão de álcool durante o período de tratamento (Gardner & Hill, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos em altas doses por longos períodos tem sido relatado na literatura (Lindmark & Muller, 1976; Voogd, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (Bendesky *et al.*, 2002). O uso prolongado deste fármaco, falhas no tratamento e má conduta terapêutica tem aumentado os níveis de resistência clínica em pacientes parasitados por *Giardia lamblia*. Na França, mais de 20% dos casos de giardíase apresentam algum grau de resistência à droga (Lemeé *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001b).

Evidências clínicas em adultos e pacientes pediátricos têm demonstrado a eficácia e segurança do tinidazol no tratamento contra a giardíase, podendo ser usado em casos onde houve falhas no tratamento com o metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007). Apesar dos efeitos

adversos relatados pelo uso deste fármaco, a exemplo de gosto amargo na boca, vertigem e perturbações intestinais, estes não são tão comuns como os causados pela utilização do metronidazol (Jokipii & Jokipii, 1979; 1982).

Um outro derivado dos 5-nitroimidazóis que é uma boa alternativa para o tratamento da giardíase é o ornidazol. Apesar dos poucos estudos realizados, este fármaco apresenta uma excelente eficácia, comparável ao tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1982; Bassily *et al.*, 1987; Kuzmicki & Jeske, 1994). Em um estudo *in vitro*, efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pelo ornidazol em culturas de sangue periférico humano foram sugeridos (López *et al.*, 2003). Apesar disso, efeitos colaterais raramente ocorrem em pacientes que fazem uso deste fármaco via oral (Escobedo & Cimerman, 2007).

O secnidazol também apresenta uma boa eficácia contra a giardíase, sendo rápida e completamente absorvido por via oral. Assim como o tinidazol e o ornidazol, este composto apresenta uma meia-vida longa (17-29 horas), o que permite a administração em dose única com concomitante diminuição dos efeitos colaterais em relação ao metronidazol (Gillis & Wiseman, 1996). Efeitos adversos têm sido relatados, a maioria notavelmente relacionada a distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.2. Quinacrina

A quinacrina é um derivado de acridina que foi primeiro introduzido como agente antimalárico em 1930. Somente em 1937 a eficácia deste composto foi demonstrada contra *Giardia*. Por muitos anos a quinacrina foi a droga de escolha no tratamento da giardíase, sendo substituída na década de 60 pelo metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação deste fármaco no parasito não está completamente elucidado. A diminuição do consumo de oxigênio pela interferência com componentes flavina de enzimas como a NADH oxidase (Paget *et al.*, 1989) e inibição da síntese de ácidos nucléicos pela ligação ao DNA (Rivas *et al.*, 2000) são proposições feitas para o modo de ação desta droga. Após administração oral, a quinacrina é totalmente absorvida pelo trato intestinal, mesmo em pacientes com diarreia severa. Sua meia-vida é longa, sendo vagorosamente excretado pelos tecidos.

A toxicidade seletiva da quinacrina se deve ao fato de que a taxa de incorporação da droga no parasito é maior do que nas células do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). Este fármaco é

eficaz contra cistos e também promove a redução do excistamento *in vitro*. Resistência induzida em culturas por quinacrina tem sido demonstrada, estando relacionada a uma diminuição da taxa de incorporação desta droga pelo protozoário (Upcroft *et al.*, 1996).

Efeitos colaterais deste fármaco incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, gosto amargo na boca e coloração amarelada ou alaranjada na pele e urina (Harris *et al.*, 2001). Outros efeitos relatados são hemólise em pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, psicose tóxica e exacerbação da psoríase (Gardner & Hill, 2001).

1.6.3. Furazolidona

Este derivado de nitrofurano foi descoberto em 1940, mas só em 1960 foi relatada sua atividade contra *Giardia lamblia* (Webster, 1960). Sua eficácia é menor do que a do metronidazol e quinacrina, porém sua grande vantagem consiste em sua formulação líquida, o que facilita a administração desta droga, principalmente em crianças (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação da furazolidona consiste na redução do seu grupo nitro pela NADH oxidase, cujos radicais citotóxicos causam danos aos componentes celulares, incluindo o DNA (Brown *et al.*, 1996a). Resistência está relacionada à diminuição das taxas de incorporação da droga pelo parasito e aumento dos níveis de enzimas com ciclagem tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. Podem também ocorrer reações semelhantes às causadas pelo dissulfiram após ingestão de álcool (Gardner & Hill, 2001). Efeitos mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura decorrentes do uso da furazolidona (Raipulis *et al.*, 2005).

1.6.4 Benzimidazóis

Inicialmente reconhecidos como drogas antihelmínticas, os benzimidazóis possuem um amplo espectro de ação, inclusive contra alguns protozoários (Escobedo & Cimerman, 2007). Dois membros dessa classe são utilizados no tratamento da giardiase, o albendazol e o mebendazol. Eles exercem seus efeitos pela ligação à β -tubulina, inibindo a polimerização dos

microtúbulos e falhas na incorporação de glicose também ocorrem (Gardner & Hill, 2001). Cacopardo *et al.* (1995) demonstraram que a combinação albendazol-metronidazol foi 100% eficaz em portadores de *G. lamblia* resistente ao metronidazol. Uma outra vantagem relacionada ao uso do albendazol é a relativa falta de efeitos colaterais. A OMS recomenda que mulheres em período gestacional só recebam tratamento com albendazol e mebendazol a partir do terceiro mês de gestação (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.5. Paromicina

A paromicina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem sido uma alternativa eficaz e menos tóxica para gestantes infectadas por *Giardia* e em caso de cepas resistentes (Hill, 1993). O mecanismo de ação proposto para este fármaco é através da inibição da síntese protéica, interferindo nas subunidades ribossômicas do parasito, que possuem tamanhos e seqüências incomuns (Katiyar *et al.*, 1994).

Após administração oral, pouco da droga é absorvida pela circulação sistêmica, atingindo altas concentrações no intestino. A maior parte da paromicina é excretada nas fezes. Em pessoas com disfunção nos rins, este fármaco pode se acumular e causar toxicidade renal (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.6. Nitazoxanida

A nitazoxanida é um 5-nitrotiazol que possui amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias, protozoários e helmintos. Estudos clínicos e *in vitro* têm confirmado a eficácia da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, no tratamento da giardíase. O mecanismo de ação é semelhante à classe dos 5-nitroimidazóis, através do grupo nitro (Adagu *et al.*, 2002). A absorção e bioviabilidade desta droga são aumentadas pela administração conjunta com alimentos (Stockis *et al.*, 2002). Uma vez fracamente absorvido pelo trato gastrintestinal, dois terços deste fármaco são expelidos pelas fezes e um terço pela urina (Broekhuysen *et al.*, 2000). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais.

1.6.7 Bacitracina complexada a sais de zinco

Este fármaco é composto de dois agentes: a bacitracina, um antibiótico produzido pela cepa Tracy-1 de *Bacillus subtilis*, e zinco, que promove estabilidade a este composto. Efeitos colaterais da bacitracina complexada a sais de zinco foram notados somente em um pequeno número de pacientes e incluem diarreia, náusea e desconforto abdominal. O uso prolongado desta droga causa problemas nefrotóxicos e distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas

O emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inapropriadas, os baixos custos e a facilidade de obtenção de determinados fármacos têm ocasionado resistência e feito com que em muitas partes do mundo, drogas como a cloroquina, penicilina e a meticilina sejam novamente utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Upcroft & Upcroft, 2001a).

Uma recente revisão do grupo dos Upcroft aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento não apenas da giardíase, como também para a amebíase e outras protozooses (Wright *et al.*, 2003).

A busca de novos fármacos para uso no combate a parasitoses intestinais vem sendo considerável. No que concerne a giardíase, diferentes drogas têm sido utilizadas, mas nenhuma é plenamente satisfatória, principalmente pela alta incidência de efeitos colaterais que justificam as contra-indicações e ocorrência significativa de falhas no tratamento. Nesse sentido, é de fundamental importância à realização de novas pesquisas em estratégias terapêuticas para a giardíase, tornando-se uma área de desenvolvimento em potencial nos próximos anos (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.7. DISSULFIRAM: NOVOS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

O dissulfiram, ou tetraetiltiuram dissulfeto, tem sido usado por mais de meio século para terapia de aversão ao álcool, através da inibição da enzima hepática aldeído desidrogenase (ALDH) (Sauna *et al.*, 2005). Sua farmacocinética tem sido extensivamente estudada, sendo considerada pela FDA e OMS uma droga segura e eficaz. Nesta última década numerosos relatos vêm sugerindo a utilização deste fármaco no tratamento do câncer e infecções fúngicas (Sauna *et al.*, 2005). A reversão do fenótipo MDR (Resistência a Múltiplas Drogas) pela inibição dos transportadores ABC, através de sua ligação com um de seus membros, a P-glicoproteína (Pgp) (Loo & Clarke, 2000; Sauna *et al.*, 2004), e seus poucos efeitos colaterais, mesmo em uso prolongado (Brewer, 1984; Chick, 1999; Brar *et al.*, 2004) fazem do dissulfiram uma droga com múltiplos alvos terapêuticos em potencial.

Recentes estudos do mecanismo pelo qual o dissulfiram exerce seus efeitos anti-álcool tem fornecido evidências para a formação de um intermediário reativo que é um potente agente carbamilante para grupos sulfidrila (Madan *et al.*, 1995). No organismo, esta droga é rapidamente e completamente reduzida a dietilditiocarbamato (DETC) (Cobby *et al.*, 1977), um conhecido inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) (Guzik *et al.*, 2005) e que forma conjugados com a *N*-acetilcisteína (NAC) (Hu *et al.*, 1997). O DETC já teve sua atividade relatada para vários protozoários parasitas, a exemplo de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e algumas espécies do gênero *Plasmodium* (Giulivi *et al.*, 1988; Bouma *et al.*, 1998; Deharo *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* possui uma larga distribuição mundial, causando síndrome da má absorção, perturbações intestinais, com dores abdominais, eliminação de fezes diarréicas e eventualmente esteatorréia. Artrite reativa também tem sido relacionada ao parasitismo por *G. Lamblia*. (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003). Vários relatos têm associado a prevalência de doenças infecciosas intestinais e status nutricional afetando ainda mais a função cognitiva, aproveitamento escolar e desenvolvimento físico de crianças (Olness, 2003).

Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, o que aumenta as taxas de prevalência nestes locais, chegando em torno de 30%, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS, 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002). Em 2004, *Giardia* foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido à sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006).

Doenças diarréicas são a causa principal de morbidade na maioria dos países em desenvolvimento (Pimentel *et al.*, 2007). A este respeito, o advento de novas drogas seguras e eficazes na terapia contra a giardíase, aliado a programas preventivos em regiões endêmicas para esta doença, poderiam reduzir consideravelmente os custos com o tratamento (Savioli *et al.*, 2006). Os impactos sócio-econômicos oriundos de políticas que promovem a saúde pública incluem uma melhor formação de recursos humanos, pela melhora do desenvolvimento cognitivo de crianças, com concomitante aumento na geração de postos de trabalho. Por consequência, haveria uma melhora na qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Nosso trabalho tem como objetivo geral o estudo do mecanismo de ação do dietilditiocarbamato (DETC) em trofozoítos de *Giardia lamblia*, objetivando uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais no tratamento contra a giardíase.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinação da suscetibilidade parasitária (IC_{50}) através de ensaios de proliferação.
- 2) Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.
- 3) Avaliação dos danos oxidativos celulares, por quantificação bioquímica da peroxidação lipídica induzida pelo DETC.
- 4) Quantificação colorimétrica de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 5) Análise por microscopia para localização da expressão de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*, através de sonda fluorescente.
- 6) Detecção de radicais livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*, pelo uso de sonda fluorescente.
- 7) Elucidação dos efeitos microbicidas do fármaco por microscopia eletrônica de transmissão, para a observação da ultraestrutura celular do parasito, possivelmente permitindo a compreensão do modo de ação do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2. Cultivo de *Giardia lamblia*

A cepa de *G. lamblia* a ser utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof^º. Dra. Frances D. Gillin, do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB são axenicamente cultivados em tubos cônicos de vidro (aproximadamente 10 mL), em meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina e 10% (volume/volume) de soro bovino inativado a 56°C por uma hora (Keister, 1983), à temperatura de 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 a 72 horas.

O meio TYI-S-33 é preparado com a seguinte composição: 19,5 mg/mL de caseína, 10,5 mg/mL de extrato de levedura, 10 mg/mL de dextrose, 2 mg/mL de cloreto de sódio, 0,6 mg/mL de fosfato de potássio monobásico, 1 mg/mL de fosfato de potássio dibásico, 2 mg/mL de L-cisteína, 1 mg/mL de bile bovina e 0,2 mg/mL de ácido ascórbico. O pH é ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1N. O meio é esterilizado em filtro a vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

4.3. Ensaio de inibição

Inóculos de 1 a 2 x 10⁵ trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DETC e/ou metronidazol, por 24 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Inóculos de 1 x 10⁶ esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 µL de [³H]-

timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1 $\mu\text{Ci/poço}$, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5. Detecção de tióis totais

Inóculos de 2×10^4 trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em tubos de 15 mL por 60-72 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC e/ou metronidazol. Em seguida as células foram centrifugadas a $500 \times g$ por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM, pH 8,2. A 20 μL da amostra foram adicionados 75 μL do mesmo tampão, 25 μL do reagente DTNB e 400 μL de metanol, sendo após centrifugado a $1500 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

4.6. Lipoperoxidação

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC e/ou N-acetilcisteína (NAC). Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação a $500 \times g$ por 10 minutos em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após centrifugação, 200 μL de 0,1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados a 200 μL de células em suspensão e incubados a 100°C por 3 horas. A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida a 532 nm e a absorbância foi comparada ao padrão obtido usando 0.1% TBA e PBS, à proporção de 1:1.

4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca/Mg, pH 7,2 por centrifugação a $500 \times g$ por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo 25 μM da sonda 5'-(6')-carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Molecular Probes). Após o período de incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes, montados em lâminas e observados ao microscópio de fluorescência.

4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol

Trofozoítos foram fixados por 30 min a 4°C em 1% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Para a adesão dos trofozoítos, as lamínulas foram lavadas com extran neutro, submersas em etanol 70% e secas sem contato manual. Foram colocadas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro e recobertas com solução de 0,1 % de poli-*L*-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Retirado o excesso desta solução, as lamínulas foram secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e, novamente, secas. As células aderidas por 30 minutos às lamínulas foram incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propilgalato e observadas no microscópio de fluorescência.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento com as drogas, as células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio neste tampão. Em seguida os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e infiltrados em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por 48 hs a 60°C, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 400 e contrastados em 5% de acetato de uranila e 15% de citrato de chumbo. As grades são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.10. Análise estatística

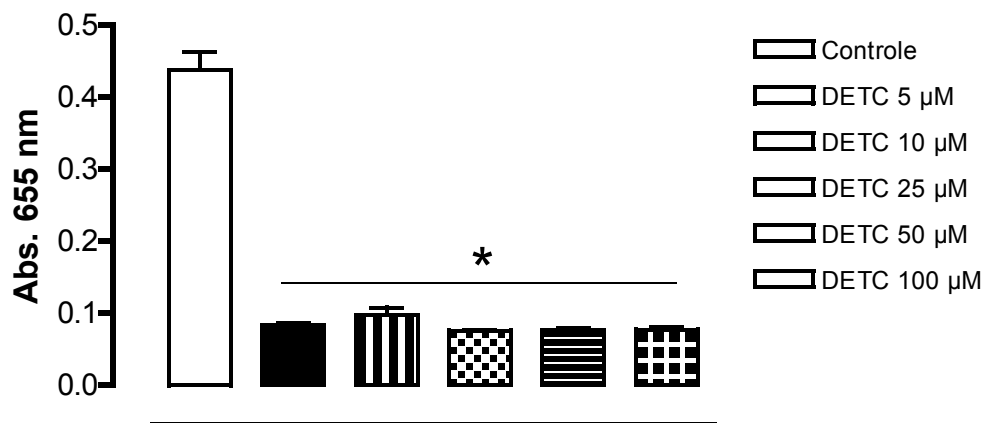
Os dados obtidos estão representados como a média ± desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de *G. lamblia*

Para avaliar a atividade inibitória do DETC na proliferação celular de *G. lamblia*, nós realizamos experimentos de dose-resposta, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM , por 24 horas. O DETC diminuiu significativamente a proliferação dos trofozoítos, não havendo diferença significativa entre as concentrações utilizadas, presumivelmente por uma ausência de efeito giardicida dose-dependente nestas concentrações (Fig. 4A). O valor de IC_{50} do DETC foi aproximadamente de 2,0 μM , o que demonstra a efetividade do DETC contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, tendo seu efeito comparado ao metronidazol, com valores de IC_{50} em torno de 1,5 μM . Apesar de discreto, aparentemente há uma relação de dose-dependência para o efeito inibitório do metronidazol neste parasito nas concentrações utilizadas (Fig. 4B).

(A)



(B)

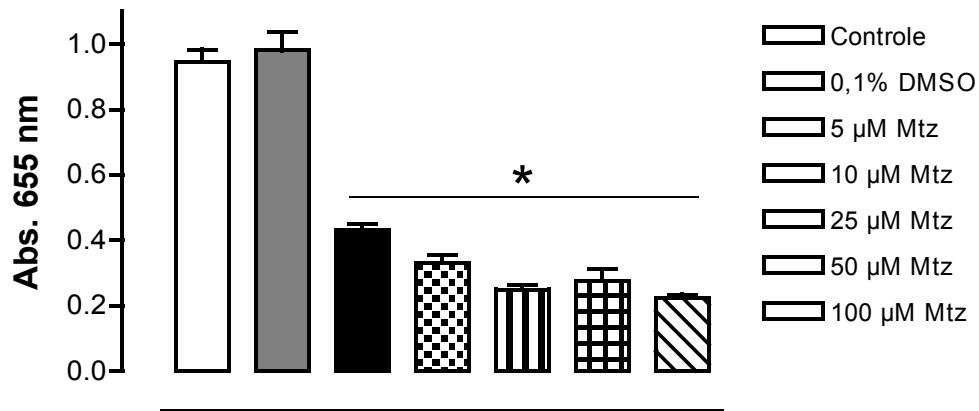


Figura 4. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular. Trofozoítos de *Giardia lamblia* expostos a diferentes concentrações de DETC e metronidazol. (A) Após 24 horas de incubação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com DETC, porém o efeito não foi dose-dependente nas concentrações testadas. (B) Em células tratadas com o metronidazol, observamos uma inibição significativa do crescimento em comparação com as células tratadas com 0,1% de DMSO, havendo uma redução dose-dependente discreta na proliferação entre 5 25 µM de concentração da droga. (*, $p < 0,001$).

5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação da concentração inibitória do DETC e metronidazol neste protozoário, nós avaliamos a associação de ambas as drogas para verificar um possível efeito sinérgico em trofozoítos de *G. lamblia*. Em células tratadas com 1 μM de DETC por 24 horas, não houve uma inibição significativa do crescimento, bem como em parasitos tratados com 1 μM de metronidazol, nas mesmas condições (Fig. 5). Quando nós fizemos as associações do DETC com o metronidazol, em diferentes concentrações de ambas e em um mesmo período de incubação, verificamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e algumas combinações, especialmente quando a concentração do metronidazol está acima de 0,5 μM , o que não ocorre quando comparamos estas combinações com o DETC ou metronidazol isoladamente (Fig. 5). Estes resultados sugerem que não há um efeito sinérgico entre estes compostos em trofozoítos de *Giardia lamblia* nas concentrações utilizadas, já que os valores de IC_{50} de ambas as drogas se encontram próximos aos valores empregados experimentalmente neste estudo.

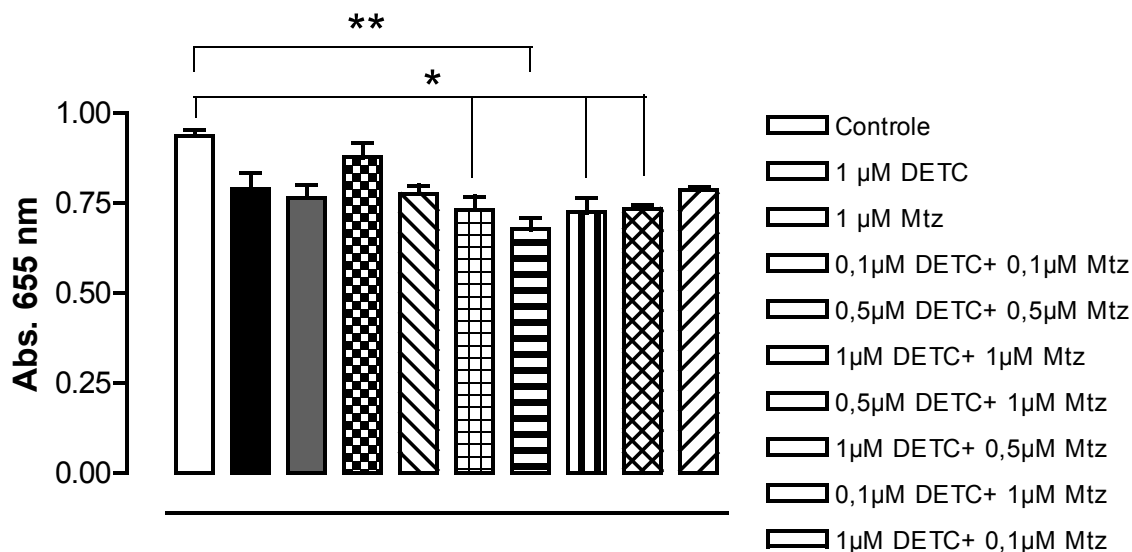
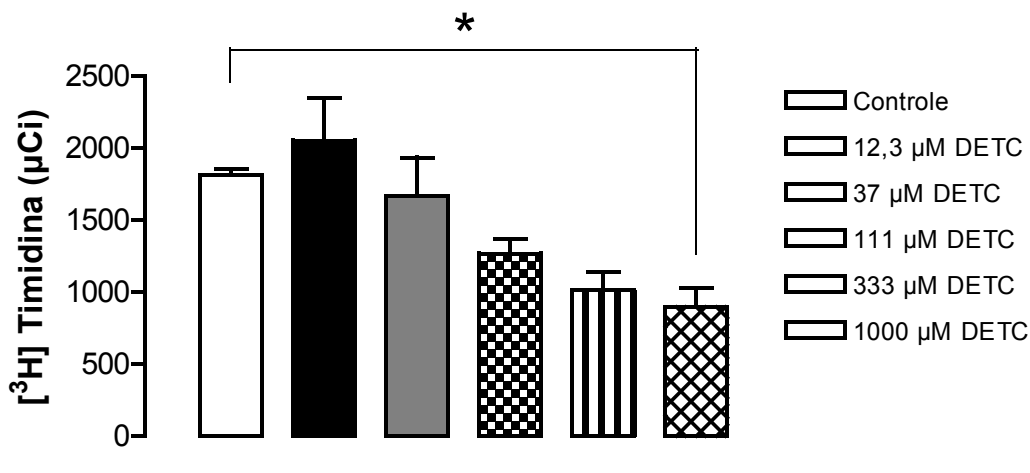


Figura 5. Avaliação de possível sinergismo entre DETC e metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*. As células foram incubadas com ambas as drogas em diferentes combinações ou isoladamente, por 24 horas. Houve uma inibição estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) da proliferação celular em parasitos tratados com concentrações mais elevadas de ambas as drogas, porém os resultados não indicam efeito sinérgico desta associação.

5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos do DETC em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com DETC, verificamos uma diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Fig. 6A). O valor de IC₅₀ para este composto em esplenócitos foi cerca de 217 µM, muito acima dos valores encontrados para seu efeito giardicida. O metronidazol não causou citotoxicidade em esplenócitos (Fig. 6B) nas mesmas concentrações utilizadas para o DETC, sugerindo que estas células são menos suscetíveis à ação do 5-nitroimidazol em comparação ao tiocomposto. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o DETC causa seu efeito citotóxico em células do baço difere significativamente do utilizado para ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

(A)



(B)

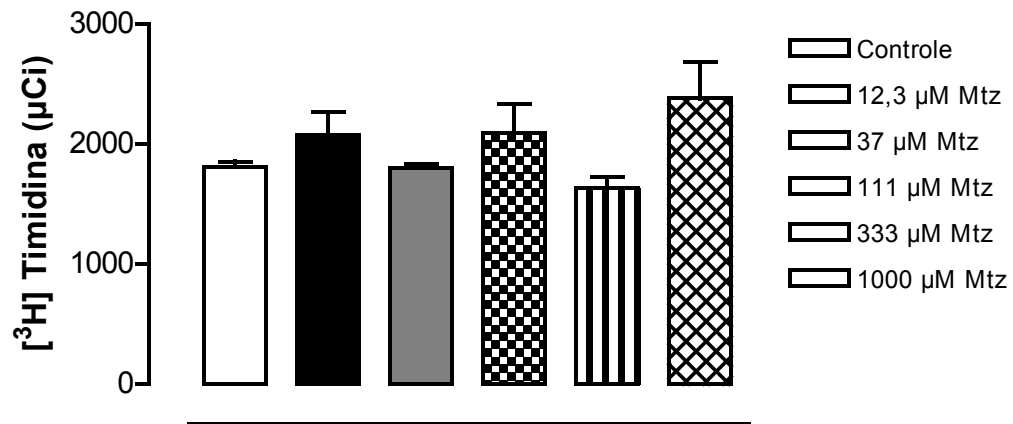


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos. Células do baço de camundongos Balb/C foram tratadas com DETC (A) ou metronidazol (B), por 24 horas. Houve uma redução da taxa de proliferação dos esplenócitos tratados com DETC, indicada pela redução da incorporação de timidina com o aumento da concentração da droga. (* $p < 0,05$). O metronidazol não reduziu a incorporação de timidina destas células, nas mesmas concentrações.

5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para verificar os possíveis efeitos causados pelo DETC neste parasito, testamos se a atividade giardicida desta substância está associada com o conteúdo dos tióis livres através da detecção pela sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA), que se liga seletivamente a grupos tiol em presença de grupamentos amino. Em parasitos controle foi observada uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de algumas células (Fig. 7A). Em parasitos tratados com DETC a 200 μ M por 24 horas, algumas células apresentavam uma marcação com intensidade menor ou ausente em comparação ao controle, indicando que o DETC está bloqueando os tióis da célula (Fig. 7C). Este resultado indica a participação dos tióis livres no efeito giardicida do composto.

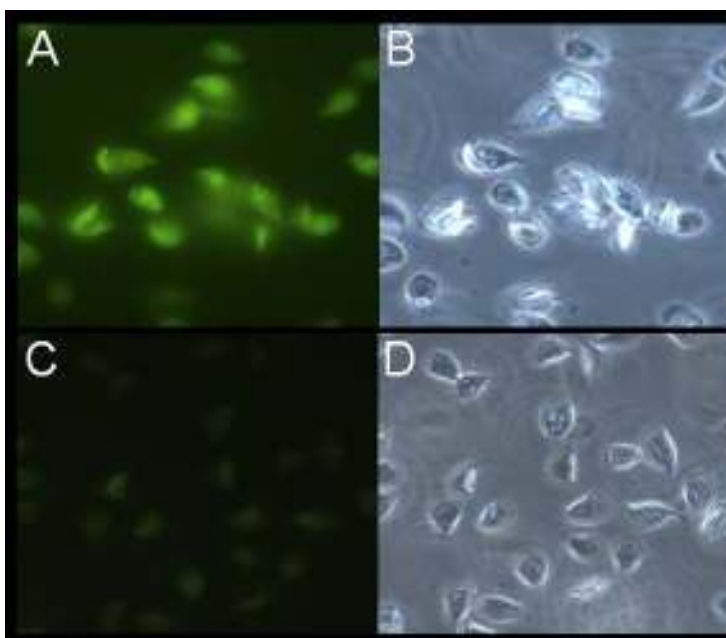


Figura 7. Análise do conteúdo de tióis livres em trofozoítos de *G. lamblia*. Detecção de grupos sulfidrila através da sonda fluorescente *orto*-phthaldialdeído (OPA – A e C). Células controle apresentam uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de alguns trofozoítos (A). Trofozoítos de *Giardia lamblia* tratados com 200 μ M de DETC por 24 horas, apresentando uma fraca marcação (C) em relação ao controle. Visualização das células por microscopia de contraste de fase (B e D).

5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com o objetivo de detectar as concentrações totais de grupos tiol presentes neste parasito, foi utilizado o reagente de Ellman (1959), que determina quantitativamente grupos sulfidril em amostras biológicas. Após 2 horas de incubação com 100 μ M de DETC, foi possível observar um decréscimo do conteúdo de grupamentos tiol totais em comparação ao controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significante (Fig. 8). O metronidazol nas mesmas concentrações não levou à diminuição destes grupos sulfidril, com níveis de detecção comparáveis aos do controle. Quando as células foram incubadas com a associação de ambos, observamos uma diminuição da expressão de grupamentos tiol, porém houve um discreto aumento em comparação ao DETC. Estes resultados sugerem que o DETC diminui a capacidade antioxidante de *G. lamblia* através do decréscimo da expressão de grupos tiol presentes neste parasito, não havendo efeitos aditivos ou sinérgicos entre os compostos.

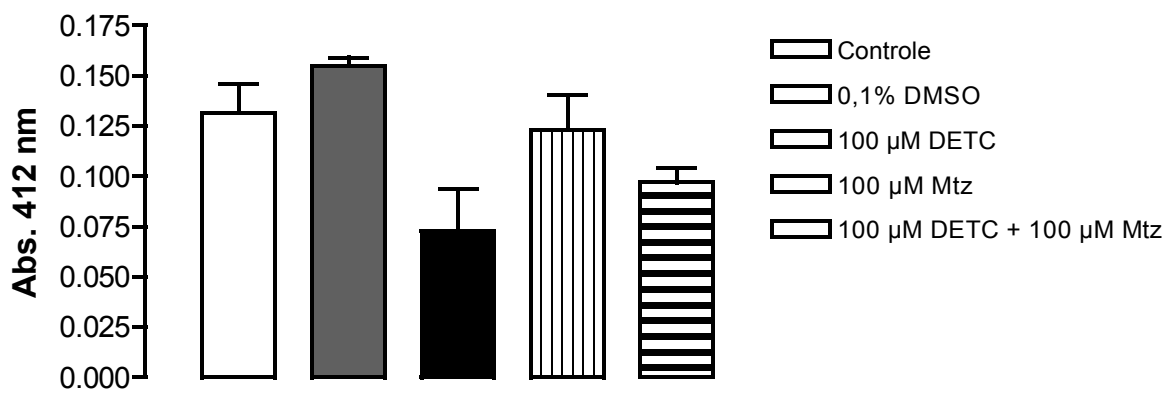


Figura 8. Quantificação dos grupos sulfidril em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Houve uma diminuição dos níveis de tióis totais em células tratadas com 100 μ M de DETC por 2 horas em relação ao controle, porém esta redução não foi estatisticamente significante ($p > 0,05$). Parasitos tratados com metronidazol apresentaram valores semelhantes ao controle e a combinação do DETC com o metronidazol levou a um discreto aumento dos níveis de tióis livres em comparação ao DETC.

5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação dos tióis livres, nós avaliamos a participação destes grupamentos na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*. Em células tratadas com 25 μ M de DETC por 24 horas, observamos um decréscimo na proliferação celular em relação às células controle (Fig. 9). A adição de 25 μ M de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultura não afetou a proliferação do parasito *in vitro*. A incubação das células com DETC e NAC, ambos a 25 μ M, levou à reversão parcial do efeito giardicida do DETC, aumentando discretamente à medida que elevamos a concentração do NAC (Fig. 9). Estes dados indicam que o efeito do DETC nestas células está associado, ao menos parcialmente, com os grupamentos tiol presentes neste parasito, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, já que a NAC não foi capaz de reverter totalmente os efeitos causados pelo DETC.

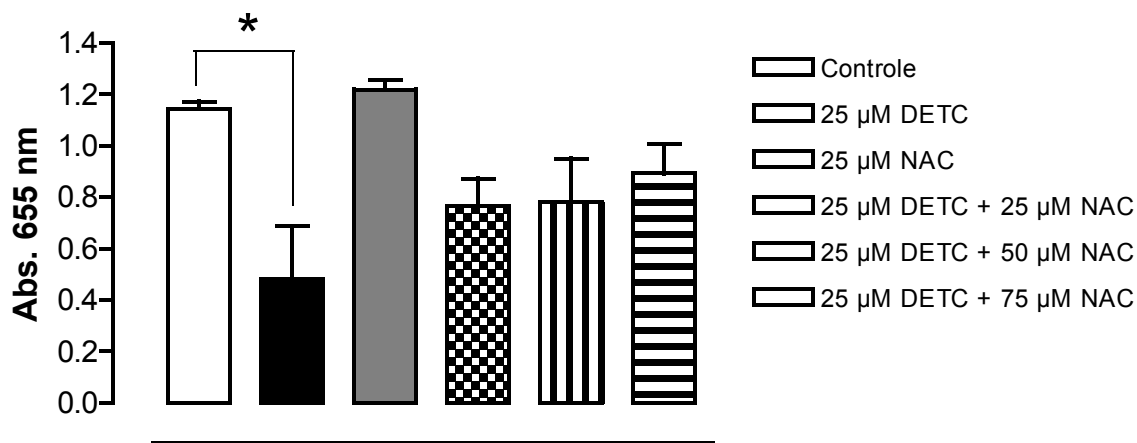
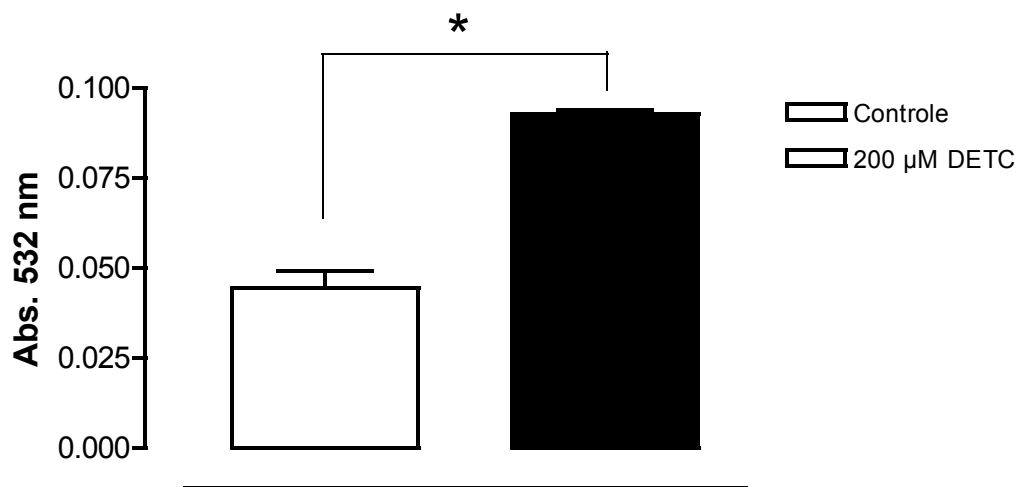


Figura 9. Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de *Giardia* em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC). Células tratadas com 25 μ M de DETC apresentaram uma redução na proliferação em comparação ao controle (*, $p < 0,05$). Quando associamos o NAC ao DETC em diferentes proporções há uma reversão parcial do efeito inibitório do DETC.

5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com a observação de que o DETC é capaz de diminuir os níveis de tióis livres neste parasito e por conseqüência a sua capacidade antioxidante, decidimos verificar os danos oxidativos celulares através da quantificação bioquímica da peroxidação lipídica através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas, houve um aumento significativo desta lipoperoxidação (Fig. 10A). A associação do DETC com a NAC foi capaz de reverter a lipoperoxidação causada pelo DETC (Fig. 10B). Estes dados sugerem que o DETC está elevando o estresse oxidativo, sendo este efeito modulado por cisteína, possivelmente pela interação destas duas moléculas com conseqüente inibição da atividade do DETC.

(A)



(B)

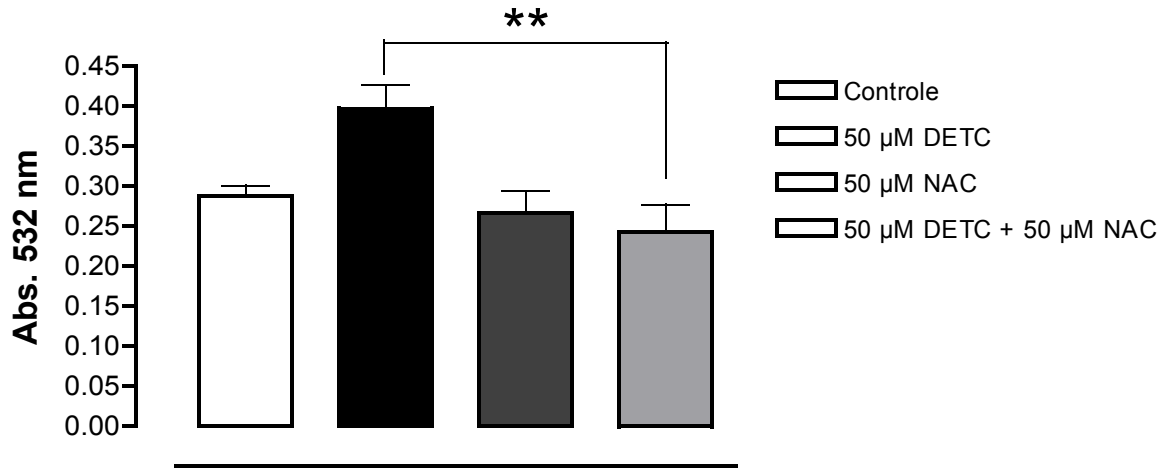


Figura 10. Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células tratadas com 200 μM de DETC por 4 horas apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle (*t* de Student, * $p < 0,001$). (B) Houve uma reversão dos efeitos do DETC quando foi realizado o co-tratamento com a NAC, em parasitos tratados por 2 horas (** $p < 0,05$).

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Como um dos efeitos do DETC é o aumento dos danos oxidativos celulares em trofozoítos de *Giardia*, resolvemos em seguida avaliar a produção espécies reativas através da sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes), que é permeável à membrana celular, se tornando impermeável no espaço intracelular quando se liga a espécies reativas de oxigênio, emitindo fluorescência. A maioria das células controle estavam viáveis, com grande motilidade ou aderidas à lâmina de vidro, não apresentando marcação para a sonda (Fig. 11A - B). Os trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora se encontravam menos móveis e com alterações morfológicas na superfície celular. Nestas células observou-se uma marcação homogênea (Fig. 11C), um pouco mais pronunciada em regiões de protuberância membranosa, conhecidas como “blebs” (Fig. 11D). Assim como no controle, as células tratadas com 200 µM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação para a sonda. Isto provavelmente se deve ao fato de que a grande maioria destas células já estavam mortas, não sendo possível a detecção da sonda intracelularmente (Fig. 11E - F).

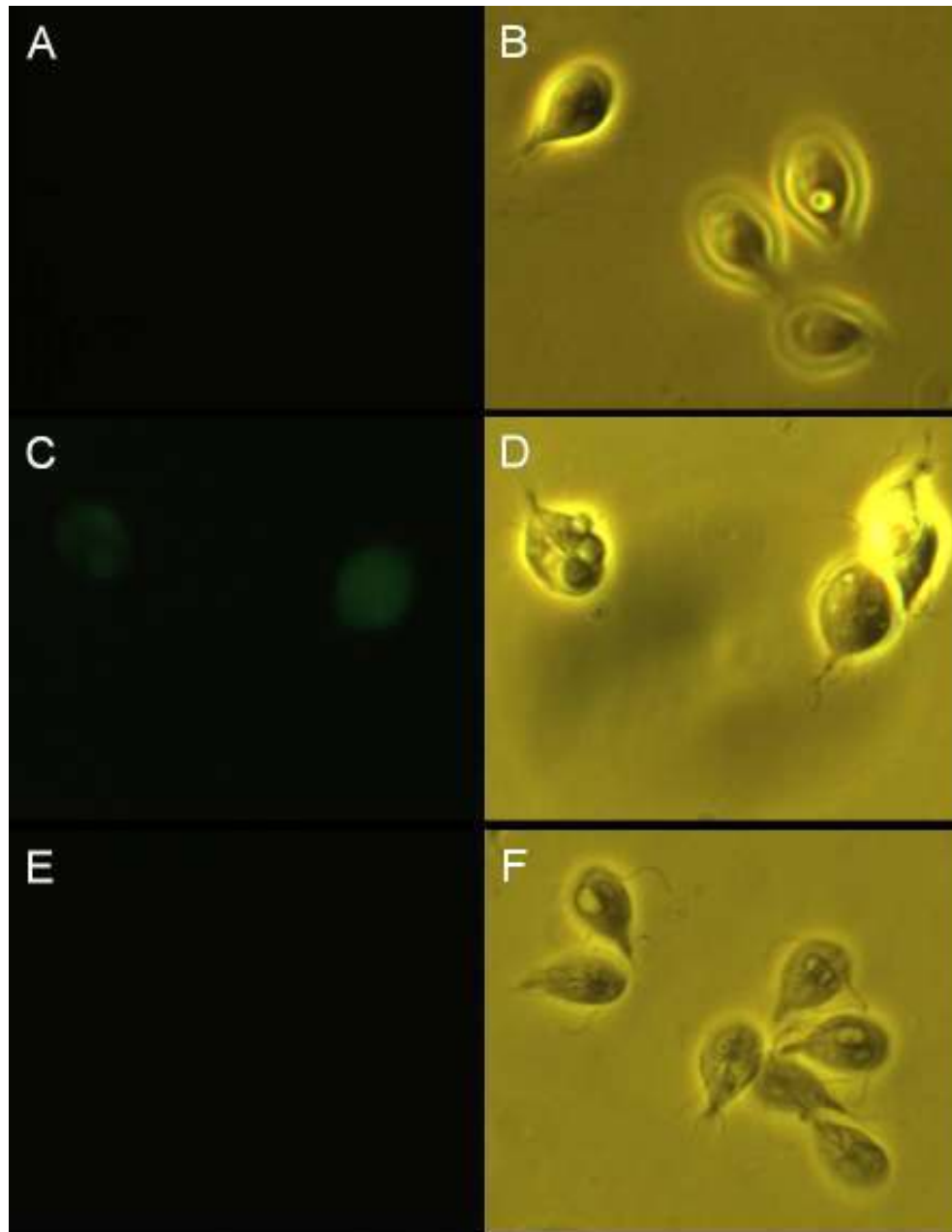


Figura 11. Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia*. A sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para detecção de espécies reativas neste parasito. Células controle não apresentaram marcação. (A e B) O tratamento com 100 μM de DETC por 1 hora levou ao aparecimento de células com alterações morfológicas (D) e marcadas com a sonda fluorescente (C). Trofozoítos tratados com 200 μM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação com H₂DCFDA (E), possivelmente porque estas já estavam mortos (F).

5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC

Para entender melhor os efeitos do DETC em trofozoítos de *G. lamblia*, nós incubamos as células em presença ou ausência de 200 μM desta substância por 24 horas e depois de processadas, foram visualizadas em MET. As células controle apresentavam-se íntegras com uma grande quantidade de partículas de glicogênio e cisternas de retículo endoplasmático distribuída pelo citoplasma (Fig. 12A). Vesículas periféricas foram observadas subjacentes à membrana plasmática (Fig. 12B). Nestas células também podemos verificar em corte transversal estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos, o funis (Fig. 12C) e o disco adesivo (Fig. 12D). Os núcleos, presentes na região anterior dos parasitos, encontravam-se homogêneos, bem delimitados pela membrana nuclear (Fig. 12D). Em parasitos tratados com DETC, mais de 50% das células apresentavam-se com alto grau de extração citoplasmática, inclusive do conteúdo nuclear (Fig. 13A). Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito (Fig. 13B), sugerido pela presença de estruturas virguliformes ou com dupla membrana circunscrevendo porções citoplasmáticas. Possível participação do retículo endoplasmático é sugerida, já que este se encontrava dilatado e próximo às vesículas (Fig. 13C), que também se apresentaram maiores e menos numerosas do que no controle, sugerindo a ocorrência de confluência das mesmas (Fig. 13D).

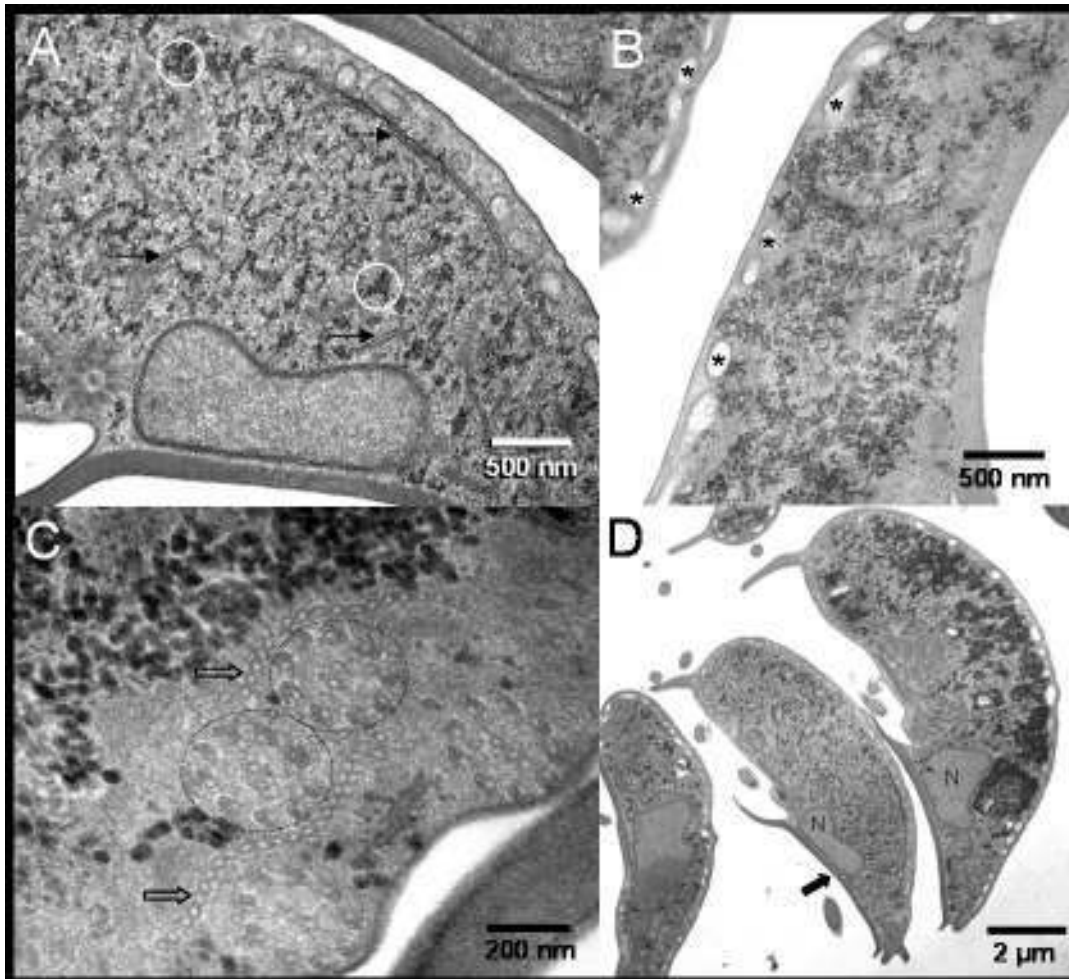


Figura 12. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células controle apresentando citoplasma homogêneo, com grânulos de glicogênio (assinalado por círculos brancos) e retículo endoplasmático (setas). Em (B), visualizamos as vesículas periféricas (*) na região dorsal da célula. (C) Estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (assinalados por círculos pontilhados) e o corpo funis (setas). Em (D), observamos células em corte longitudinal apresentando núcleos (N) e o disco adesivo (seta).

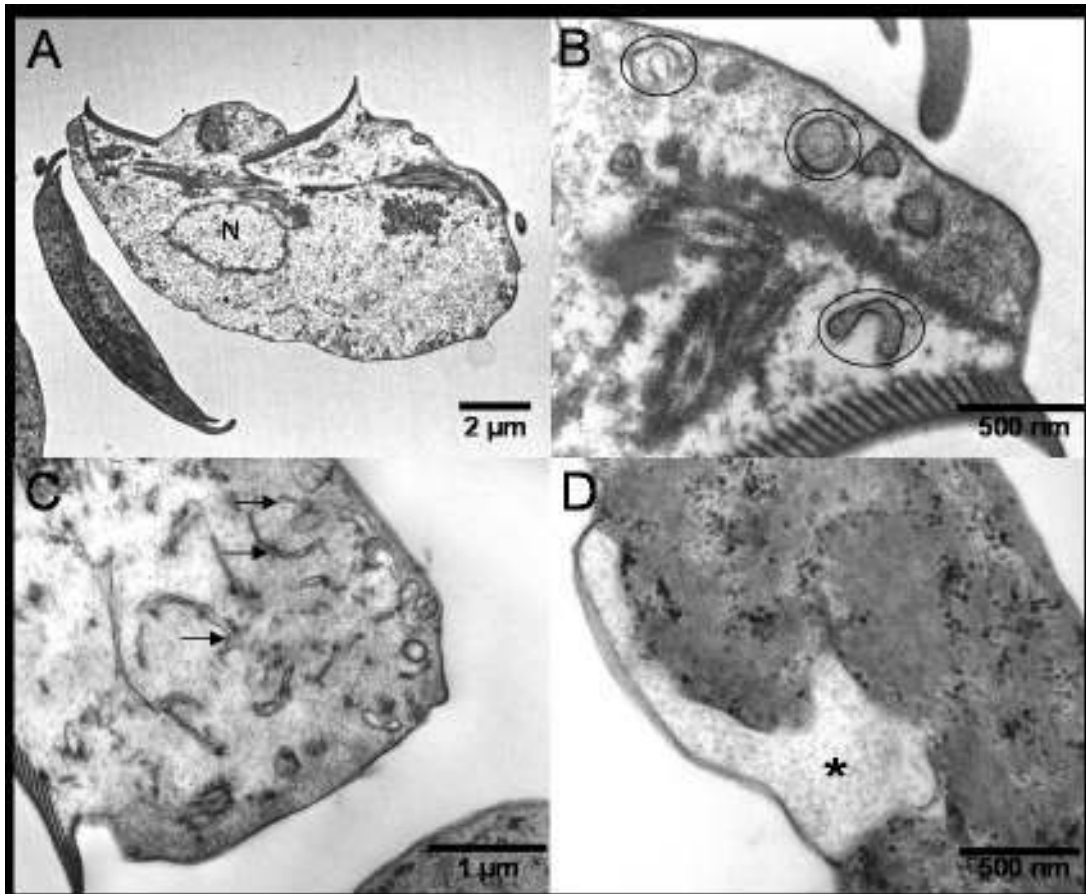


Figura 13. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *G. lamblia* tratados com DETC. (A) Células tratadas com 200 µM de DETC por 24 horas apresentando reduzida eletrondensidade de citoplasma e nucleoplasma, em comparação às células controle (Fig. 12). **(B)** Visualização de vesículas virguliformes ou com dupla membrana (assinaladas por círculos), sugerindo possíveis processos autofágicos. Em **(C)**, observamos este mesmo processo, com provável participação do retículo endoplasmático, que se encontra mais dilatado quando comparado ao controle. Em **(D)**, visualizamos uma célula apresentando grande compartimento alongado, presumivelmente formado pela fusão homofílica das vesículas periféricas.

6. DISCUSSÃO

A elucidação dos efeitos do DETC, um conhecido inibidor de SOD, é de importância fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em sua atividade giardicida, já que a ausência de SOD em *Giardia* nos permite evidenciar a existência de efeitos independentes desta enzima, produzidos pela ação do DETC em protozoários parasitas.

Apesar de ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, a inibição da proliferação celular pelo DETC aparentemente não é dose-dependente. Uma das possíveis explicações para este fato é que esta substância pode ser oxidada de forma muito rápida, principalmente em soluções, perdendo parte da sua atividade. Outra possibilidade é que o composto atue sobre um limitado “pool” de resíduos de cisteína, assim o efeito atingiria um plateau ao reagir com os grupos SH disponíveis. A manipulação deste composto precisa ser feita com presteza, evitando sua exposição ao ar e/ou aumento da temperatura. Embora seja uma droga relativamente instável, seu efeito giardicida é bastante satisfatório, com níveis comparáveis ao do metronidazol *in vitro*.

O dissulfiram, medicamento utilizado no tratamento contra o alcoolismo, age como um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Brien & Loomis, 1985). Este fármaco sofre rápida redução enzimática no sangue pela glutathione redutase (Strömme, 1963; Cobby *et al.*, 1977), mas pode também ser reduzido de forma não enzimática pela albumina (Agarwal *et al.*, 1983). Subseqüentemente, DETC é metabolizado por tiol metiltransferase ou tiopurina metiltransferase a DETC-Me (Gessner & Jakubowski, 1972; Glauser *et al.*, 1993; Lill *et al.*, 1996), que sofre oxidação principalmente pelo citocromo P-450, com uma contribuição minoritária de flavina monooxigenases (Johansson *et al.*, 1989). Os metabólitos oxidados do dissulfiram têm sido descritos como potentes inibidores da ALDH, através da carbamilação de um grupo tiol crítico no sítio ativo da enzima (Jin *et al.*, 1994; Tonkin *et al.*, 2003).

Por ser reduzido rapidamente *in vivo* a DETC, o dissulfiram se torna uma poderosa ferramenta quimioterápica no tratamento contra a giardíase. Este fármaco já foi testado *in vitro* e *in vivo* contra *Giardia lamblia* (Nash & Rice, 1998), com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para o DETC com trofozoítos *in vitro*.

Quando analisamos a associação do DETC com o metronidazol, verificamos que não houve um efeito sinérgico entre estas duas drogas. Em *Entamoeba histolytica*, o metronidazol é capaz de se ligar covalentemente a algumas proteínas específicas, incluindo superóxido dismutase e tioredoxina redutase, esta última sendo uma das responsáveis pela ativação do

metronidazol neste protozoário através da redução do grupo nitro (Leitsch *et al.*, 2007). Além disso, os níveis de cisteína são reduzidos com a adição do metronidazol, provavelmente pela reação desta droga com os grupos sulfidríla acessíveis neste parasito (Leitsch *et al.*, 2007). Como a tioredoxina redutase é uma enzima muito comum, é provável que processos similares ocorram em outros organismos procarióticos e/ou eucarióticos. Nesse sentido, o efeito giardicida do DETC e metronidazol pode estar associado à competição de ambas as drogas pelos mesmos mecanismos de ativação em *Giardia lamblia*, que apresenta uma enzima semelhante à tioredoxina redutase, a dissulfeto redutase (Brown *et al.*, 1996b) e proteínas ricas em cisteína (Luján & Nash, 1994). Em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, o mecanismo deste 5-nitroimidazol está relacionado à sua redução pela piruvato:ferredoxina oxidoreductase a radicais citotóxicos que levam a danos irreversíveis e morte celular (Müller, 1986). Apesar disso, resistência ao metronidazol em *E. histolytica* pode ser atribuída à diminuição de enzimas antioxidantes, como peroxiredoxina (Wassmann *et al.*, 1999) e superóxido dismutase (Samarawickrema *et al.*, 1997), assim como em *G. lamblia*, onde o aumento da atividade da enzima NADH oxidase tem sido associado a cepas resistentes ao metronidazol (Ellis *et al.*, 1993).

Alguns trabalhos têm desencorajado a utilização do dissulfiram e metronidazol em associação, principalmente pelo acúmulo de acetaldeído causado pela inibição da enzima ALDH por estes fármacos (Gardner & Hill, 2001) em pacientes que fazem ingestão de álcool, levando ao efeito “antabuse” (sensação de calor, náusea, vômitos e taquicardia) (Finegold, 1980; Edwards *et al.*, 1986; Krulewitch, 2003). A utilização destas duas drogas em conjunto poderia potencializar este efeito, além de causar em alguns pacientes reações psicóticas, conforme alertado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu bulário eletrônico.

Quando analisamos a incorporação de timidina por células do baço na presença de diferentes concentrações de DETC ou metronidazol, observamos que não houve uma diferença significativa nos níveis de incorporação entre as células controle e tratadas com o metronidazol. No entanto, o DETC apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas concentrações acima de 111 μM . Apesar disso, o valor de IC_{50} encontrado para trofozoítos de *Giardia* (*i.e.* 2 μM) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A farmacocinética e os efeitos colaterais do dissulfiram têm sido extensivamente estudados, gerando dados para a elaboração de formulações e regimes terapêuticos apropriados. Sua biodisponibilidade é maior que 80% após administração oral e a eliminação do dissulfiram e

seus metabólitos é um processo lento. Aproximadamente 20% da droga permanece no corpo após 1 a 2 semanas (Ellenhorn *et al.*, 1997 *apud* Sauna *et al.*, 2005). Apesar de ser recomendado o monitoramento de pacientes que usam altas doses do dissulfiram (acima de 250 mg por dia) (Fuller & Gordis, 2004), existem poucos efeitos colaterais associados com longos períodos de tratamento. Hepatotoxicidade é a causa mais comum de preocupações durante a utilização do dissulfiram (Sauna *et al.*, 2005), contudo este efeito adverso é geralmente reversível quando seu uso é interrompido na presença de manifestações clínicas (Wright *et al.*, 1988). A excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais graves tornam o dissulfiram uma droga segura e eficaz, inclusive com aprovação pela FDA e ANVISA.

A redução nos níveis de grupamentos tiol em trofozoítos tratados com DETC foi observada tanto por microscopia de fluorescência, quanto pela avaliação quantitativa através do reagente de Ellman (DTNB). Estes resultados sugerem que o DETC esteja carbamilando e/ou formando pontes dissulfeto com grupamentos tiol livres que estão presentes em *Giardia* e que são responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito, a exemplo das proteínas ricas em cisteína e dissulfeto redutase. De modo interessante, a atividade do dissulfiram em trofozoítos de *G. lamblia* foi reduzida pela adição de cisteína ao meio (Nash & Rice, 1998), sugerindo que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga. O metronidazol também reduziu os níveis de tióis totais em *Giardia*, porém não houve diferenças entre o tratamento com as drogas feito isoladamente ou em conjunto.

Cepas de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol estão associadas a um aumento da atividade da enzima NADH oxidase, possibilitando a detoxificação de espécies oxidativas (Ellis *et al.*, 1993). É provável que cepas sensíveis ao metronidazol sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, já que estas apresentam diminuição do consumo de O₂ (Ellis *et al.*, 1993), com possível redução dos níveis de grupos sulfidril livres, que podem ser oxidados através da ativação do grupo nitro deste fármaco.

Para confirmar o papel dos grupamentos tiol no efeito giardicida do DETC, nós incubamos os trofozoítos de *Giardia* em concentrações crescentes de NAC, associadas ou não a este composto. Não houve diferenças significativas entre células tratadas com 25 µM de NAC e o grupo controle, porém houve uma diminuição significativa da proliferação celular quando adicionamos 25 µM de DETC ao meio de cultura. A pré-incubação do NAC com o DETC na proporção 1:1 reverteu parcialmente a inibição, aumentando discretamente à medida que esta proporção de NAC foi aumentada. A presença de resíduos de cisteína tem sido enfatizada na

literatura como um fator de crescimento essencial para *Giardia lamblia* (Luján & Nash, 1994), conferindo proteção contra os efeitos letais do oxigênio (Fairlamb, 1989). As análises de incorporação de L-cisteína por este parasito indicam a presença de ao menos dois sistemas de transporte. L-cistina não foi incorporada pelos trofozoítos, sugerindo a ausência de um sistema de transporte e a especificidade dos transportadores de cisteína. *Giardia* não é capaz de sintetizar cisteína ou metionina a partir de sulfato, nem de converter metionina em cisteína, sendo assim o protozoário é auxotrófico para este aminoácido (Luján & Nash, 1994).

As CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície (VSPs), são os principais antígenos de *Giardia lamblia*. Cerca de 150 diferentes genes que codificam estas proteínas tem sido identificados no genoma deste parasito. Somente uma VSP é expressa por trofozoíto, permitindo que *Giardia* mude a expressão desta proteína em sua superfície (Nash, 2002). O mecanismo desta variação antigênica ainda não está claro, mas este não envolve rearranjo de DNA e é refletido por mudanças na expressão gênica em nível de RNA mensageiro (Nash, 2002). Diferenciação pode induzir variação antigênica *in vitro* (Svärd *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002;) e *in vivo* (von Allmen *et al.*, 2004). Análises de anticorpos IgA anti-*Giardia* em leite materno de mães que vivem em área endêmica de giardíase, provavelmente com múltiplas infecções com diferentes cepas de *Giardia*, revelou que as VSPs são as proteínas imunorreativas dominantes (Téllez *et al.*, 2005).

Estes dados nos indicam que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga, apesar de não ser o único. Em 1930, o dissulfiram começou a ser utilizado como escabicida e vermífico por ser um quelante de cobre, um componente essencial da cadeia respiratória de artrópodes e helmintos (Eneanya *et al.*, 1981). A atividade quelante de metal também é relatada para o DETC, que é um específico inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (Pritsos *et al.*, 1989; Majid & Nishiyama, 2002). As proteínas com motivos dedo de zinco são essenciais para o funcionamento celular normal (Berg & Shi, 1996), tornando-se um importante alvo terapêutico (Rein *et al.*, 1997). *Giardia* expressa altos níveis de CRP na superfície, as quais possuem motivos dedo de zinco (Luján *et al.*, 1995c). O zinco pode ser quelado pelo DETC, se apresentando como uma outra via de atuação desta droga neste parasito.

Os danos oxidativos celulares em membranas de trofozoítos tratados com DETC foram avaliados através da formação de um produto citotóxico, o malondialdeído (MDA), que se liga ao TBA gerando uma reação colorimétrica indicativa da peroxidação lipídica (Bellé *et al.*, 2004). Houve um aumento significativo da lipoperoxidação em parasitos tratados com 200 µM DETC,

por 4 horas. O metronidazol levou a um aumento discreto da peroxidação lipídica e a associação entre o DETC e o metronidazol não elevou significativamente a peroxidação, com níveis comparáveis ao DETC utilizado isoladamente, provavelmente porque a concentração do DETC já estava alta, levando ao plateau da peroxidação celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, no entanto as membranas são um dos componentes mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997). Este processo pode levar à morte celular através de alterações na estrutura e permeabilidade de membrana, levando à perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas (Hershko, 1989). O NAC foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do DETC, demonstrando a importância dos grupamentos tiol no mecanismo de ação desta droga.

Baseado na confirmação de que o DETC promove lipoperoxidação, provavelmente pelo aumento da geração de radicais livres de oxigênio, resolvemos avaliar a produção de espécies reativas por esta droga em *Giardia lamblia* com a sonda fluorescente H₂DCFDA. As células controle não apresentaram marcação para a sonda, enquanto que trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora foram marcados de forma homogênea, demonstrando que este tiocomposto está aumentando a formação de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Isto se deve ao fato de que a redução de grupos sulfidril livres pode estar afetando o potencial redutor deste parasito, levando ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo não pôde ser visualizado em células tratadas com 200 µM de DETC, possivelmente porque estas já se encontravam mortas.

Os metabólitos mais comuns produzidos pela utilização do oxigênio em organismos aeróbicos são o radical superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que participa da reação que produz o radical hidroxila (OH[•]), sendo este último extremamente reativo (Cadenas, 1989). Superóxido é usualmente detoxificado pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água por catalase, peroxidase e a enzima dependente de glutathione, glutathione peroxidase (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). Além destas enzimas de detoxificação convencionais, mecanismos alternativos podem ser utilizados para diminuição do estresse oxidativo celular, que incluem as dioxigenases e monooxigenases (citocromo P-450 redutase) (Malmström, 1982). Algumas oxidases dependentes de flavina (NADH oxidase) reduzem tetravalentemente o oxigênio a água, abolindo a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em bactérias anaeróbicas (Schmidt *et al.*, 1986), assim como a NADH peroxidase,

uma flavoenzima envolvida na redução do peróxido que também desempenha papel antioxidante em algumas células (Stanton & Jensen, 1993).

Alguns protozoários microaerófilos também possuem NADH oxidase. *Entamoeba histolytica* contém uma NADPH oxidase dependente de flavina que produz peróxido quando purificada (Lo & Reeves, 1980). *Trichomonas vaginalis* contém uma flavo-oxidase que produz água, além de uma NADPH oxidase produtora de peróxido (Linstead & Bradley, 1988). *Giardia* também apresenta atividades oxidase e peroxidase dependentes de NADH (Brown *et al.*, 1996a; Brown *et al.*, 1998), responsáveis pela capacidade deste parasito de detoxificar o oxigênio. As principais enzimas de detoxificação de espécies oxidantes, como a SOD, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase não estão presentes neste protozoário, salientando a importância da manutenção de um ambiente intracelular redutor através da ciclagem redox pelos grupos sulfidril presentes em *Giardia*.

A elucidação dos efeitos microbicidas do DETC foi possibilitada pela microscopia eletrônica de transmissão, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 24 horas, houve um alto grau de extração citoplasmática, apresentada por mais de 50% das células. Este efeito é causado provavelmente pelo colapso do potencial de membrana, com conseqüente rompimento da membrana plasmática pelo aumento do estresse oxidativo (Lloyd *et al.*, 2000), onde a indução de radicais livres de oxigênio leva a uma inativação de sistemas que consomem oxigênio, acúmulo de peróxido de hidrogênio e oxidação de grupos tiol.

Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito, sugeridos pela presença de estruturas virguliformes ou com membrana dupla, que são semelhantes à formação dos vacúolos em organismos eucariotos (Suzuki & Ohsumi, 2007; Xie & Klionsky, 2007).

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento de sua homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Os mecanismos envolvem a formação de uma estrutura de dupla membrana dentro da célula, chamada de vacúolo autofágico ou autofagossomo, a partir do retículo endoplasmático e vias secretórias iniciais. A fusão com o lisossomo gera o autofagolisossomo, onde as enzimas hidrolíticas agem na degradação do conteúdo interno (Shintani & Klionsky, 2004). Resposta a condições de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismos de autofagia. É possível que *Giardia* também utilize destes mecanismos para evitar a perda da homeostasia com

o aumento do estresse oxidativo, como ocorre em outros tipos celulares (Hill *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

A observação de vesículas que se encontravam maiores e menos numerosas em comparação ao controle nos leva a crer que ocorreu a fusão homofílica destes compartimentos. Este processo pode ter sido mediado por pontes dissulfeto que se formam pela ação do DETC entre as cisteínas das proteínas celulares, conferindo uma modificação da conformação tridimensional à molécula, expondo sítios de reconhecimento e/ou catalíticos e ocasionando uma série de alterações na morfologia e funcionamento normais da célula.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem do estresse oxidativo e conteúdo de grupos tiol podem prover valiosas estratégias terapêuticas para a giardíase.

7. CONCLUSÕES

7.1. O DETC mostrou-se efetivo na inibição da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, porém este efeito aparentemente não é dose-dependente;

7.2. A associação do DETC com o metronidazol não levou a um efeito sinérgico *in vitro*;

7.3. O DETC promove a redução dos níveis de grupos sulfidril livres, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto e/ou carbamilações em moléculas ricas em cisteína que estejam com estes grupamentos tiol acessíveis, como as CRPs, uma das responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito;

7.4. O aumento do estresse oxidativo em trofozoítos de *G. lamblia* pode ser devido à diminuição da capacidade antioxidante deste protozoário, inviabilizando a sua sobrevivência;

7.5. Os resultados apresentados neste trabalho apontam para uma nova abordagem na terapia contra a giardíase. Estudos para avaliação dos efeitos do DETC *in vivo* se colocam como perspectivas em nosso trabalho.

8. REFERÊNCIAS

- ADAGU, I.S., NOLDER, D., WARHURST, D.C., ROSSIGNOL, J.F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, 49:103-11, 2002.
- ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, 14: 447-75, 2001.
- AGARWAL, R.P., MCPHERSON, R.A., PHILLIPS, M. Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 42: 293-310, 1983.
- AL-MEKHLAFI, M.S., AZLIN, M., NOR AINI, U., SHAIK, A., SA'IAH, A., FATMAH, M.S., ISMAIL, M.G., AHMAD FIRDAUS, M.S., AISAH, M.Y., ROZLIDA, A.R., NORHAYATI, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 686-91, 2005.
- APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, 21: 370-6, 2005.
- BASSILY, S., FARID, Z., EL-MASRY, N.A., MIKHAIL, E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J Trop Med Hyg**, 90: 9-12, 1987.
- BELLÉ, N.A., DALMOLIN, G.D., FONINI, G., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 22: 245-51, 2004.
- BENCHIMOL, M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett**, 1:81-7, 2004.
- BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, 511: 133-44, 2002.
- BERG, J.M., SHI, Y.. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, 23: 1081-5, 1996.
- BERNANDER, R., PALM, J.E., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol**, 3: 55-62, 2001.
- BIAGINI, G.A., PARK, J.H., LLOYD, D., EDWARDS, M.R. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. **Microbiology**, 147: 3359-65, 2001.
- BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharm. J**, 234: 271-4, 1991.
- BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J.P. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronida-

- zole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**, 42: 817-20, 1998.
- BRAR, S.S., GRIGG, C., WILSON, K.S., HOLDER, W.D., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A.J., WHORTON, A.R., STOWELL, G.W., WHITTALL, L.B., WHITTLE, R.R., WHITE, D.P., KENNEDY, T.P.. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol Cancer Ther**, 3: 1049-60, 2004.
- BREWER, C. How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. **Br J Psychiatry**, 144: 200-2, 1984.
- BRIEN, J.F., TAM, G.S., CAMERON, R.J., STEENAART, N.A., LOOMIS, C.W. A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrazolethiol, calcium carbimide, and disulfiram. **Can J Physiol Pharmacol**, 63: 438-43, 1985.
- BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.
- BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., EDWARDS, M.R., UPCROFT, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.
- BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Eur J Biochem**, 1:155-61, 1996a.
- BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 20: 211-20, 1996b.
- BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 72: 47-56, 1995.
- BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 61: 155-8, 1993.
- BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, 125: 11-9, 2002.
- BUSATTI, H.G., GOMES, M.A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, 101: 819-21, 2007.
- CACOPARDO, B., PATAMIA, I., BONACCORSO, V., DI PAOLA, O., BONFORTE, S., BRANCATI, G. Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole-resistant giardiasis **Clin Ter**, 146: 761-7, 1995.
- CADENAS, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. **J Biolumin Chemilumin**, 4: 208-18, 1989.

CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Bras. Soc. Med. Trop**, 28: 25-31, 1995.

CARRANZA, P.G., FELTES, G., ROPOLO, A., QUINTANA, S.M., TOUZ, M.C., LUJÁN, H.D. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. **Infect Immun**, 70: 5265-8, 2002.

CHICK, J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. **Drug Saf**, 20: 427-35, 1999.

CHIEN, C.T., SHYUE, S.K., LAI, M.K. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. **Transplantation**, 15: 1183-90, 2007.

CIMERMAN, B., CURY, F.M., MORENO, C.T. Avaliação terapêutica do secnidazol dose única no tratamento da giardíase em crianças. **Pediatr. Mod**, 6: 1008-1012, 1994.

COBBY, J., MAYERSOHN, M., SELIAH, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, 202: 724-31, 1977.

CRUZ, C.C., FERRARI, L., SOGAYAR, R. A therapeutic trial in *Giardia muris* infection in the mouse with metronidazole, tinidazole, secnidazole and furazolidone **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 223-8, 1997.

DA COSTA-MACEDO, L.M., MACHADO-SILVA, J.R., RODRIGUES-SILVA, R., OLIVEIRA, L.M., VIANNA, M.S. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum communities of the city of Rio de Janeiro, Brazil **Cad Saude Publica**, 14: 851-5, 1998.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIN, J., LECLAIRE, C. Treatment of giardiasis (lambliasis) with metronidazole. Apropos of 100 cases. **Presse Med**, 6: 15-6, 1962.

DEHARO, E., BARKAN, D., KRUGLIAK, M., GOLENSER, J., GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. **Biochem Pharmacol**, 1: 809-17, 2003.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, 45: 2471-6, 1986.

DUREL, P., ROIRON, V., SIBOULET, A., BOREL, L.J. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. **Br J Vener Dis**, 36: 21-6, 1960.

ECKMANN, L., LAURENT, F., LANGFORD, T.D., HETSKO, M.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F., GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol**, 1: 1478-87, 2000.

- EDWARDS, D.L., FINK, P.C., VAN DYKE, P.O. Disulfiram-like reaction associated with intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole and metronidazole. **Clin Pharm**, 5: 999-1000, 1986.
- ELLIS, J.E., WINGFIELD, J.M., COLE, D., BOREHAM, P.F., LLOYD, D. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 23: 35-9, 1993.
- EMMERLICH, V., SCHOLZE, H., GILLIN, F.D., BAKKER-GRUNWALD, T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 87: 112-5, 2001.
- EMMERLICH, V., SANTARIUS, U., BAKKER-GRUNWALD, T., SCHOLZE, H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 131-4, 1999.
- ENEANYA, D.I., BIANCHINE, J.R., DURAN, D.O., ANDRESEN, B.D. The actions of metabolic fate of disulfiram. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 21: 575-96, 1981.
- ERTAN, P., YERELI, K., KURT, O., BALCIOĞLU, I.C., ONAĞ, A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. **Pediatr Int**, 44: 286-8, 2002.
- ESCOBEDO, A.A., CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother**, 8: 1885-902, 2007.
- FAIRLAMB, A.H. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. **Parasitology**, Suppl: 93-112, 1989.
- FARTHING MJ. Giardiasis. **Gastroenterol Clin North Am**, 25: 493-515, 1996.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev**, 13: 35-54, 2000.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J Parasitol**, 77: 441-8, 1991.
- FEELY, D.E., DYER, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. **J Protozool**, 34: 80-3, 1987.
- FEITOSA, G., BANDEIRA, A.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R., BRITES, C. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect. Dis**, 5: 339-44, 2001.
- FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev Assoc Med Bras**, 43: 61-8, 1997.
- FINEGOLD, S.M. Metronidazole. **Ann Intern Med**, 93: 585-7, 1980.
- FERNANDES, P.D., ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz J Med Biol Res**, 30: 93-9, 1997.

FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54: 679-708, 1997.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**, 15: 7761-4, 1989.

FULLER, R.K., GORDIS, E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? **Addiction**, 99: 21-4, 2004.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, 14: 114-28, 2001.

GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J., WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther**, 266: 23-32, 1993.

GASCÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, 73: 102-8, 2006.

GESSNER, T., JAKUBOWSKI, M. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester. A metabolite of disulfiram. **Biochem Pharmacol**, 15: 219-30, 1972.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., MCCAFFERY, J.M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679-705, 1996.

GILLIN, F.D., REINER, D.S., BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. **Infect Immun**, 56: 705-7, 1988.

GILLIS, J.C., WISEMAN, L.R. Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, 51: 621-38, 1996.

GIULIVI, C., TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 30: 243-51, 1988.

GU, F., CRUMP, C.M., THOMAS, G. Trans-Golgi network sorting. **Cell Mol Life Sci**, 58: 1067-84, 2001.

GUERRANT, R.L., KIRCHHOFF, L.V., SHIELDS, D.S., NATIONS, M.K., LESLIE, J., DE SOUSA, M.A., ARAUJO, J.G., CORREIA, L.L., SAUER, K.T., MCCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J Infect Dis**, 148: 986-97, 1983.

GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.T.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop**, 37: 501-06, 1995.

GUZIK, T.J., OLSZANECKI, R., SADOWSKI, J., KAPELAK, B., RUDZIŃSKI, P., JOPEK, A., KAWCZYŃSKA, A., RYSZAWA, N., LOSTER, J., JAWIEN, J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., CHANNON, K.M., KORBUT, R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. **J Physiol Pharmacol**, 56: 313-23, 2005.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*-current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res**, 88: 591, 2002.

HARRIS, J.C., PLUMMER, S., LLOYD, D. Antigiardial drugs. **Appl Microbiol Biotechnol**, 57: 614-9, 2001.

HALL, A.; NAHAR, Q. Albendazole as a treatment for infectious with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 87: 84-6, 1993.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.

HILL, B.G., HABERZETTL, P., AHMED, Y., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth muscle cell. **Biochem J**, 3, 2007.

HILL, D.R. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infect. Dis. Clin. N. A**, 7: 503-25, 1993.

HILL GASTON, J.S., LILICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 17: 219-39, 2003.

HU, P., JIN, L., BAILLIE, T.A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. **J Pharmacol Exp Ther**, 281: 611-7, 1997.

ISAAC-RENTON, J., MOOREHEAD, W., ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. **Appl. Environ. Microbiol**, 62: 47-54, 1996.

ISAAC-RENTON, J.L., CORDEIRO, C., SARAFIS, K., SHAHRIARI, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. **J Infect Dis**, 167: 431-40, 1993.

JARROLL, E.L., SENER, K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. **Drug Resist Updat**, 6: 239-46, 2003.

JIN, L., DAVIS, M.R., HU, P., BAILLIE, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. **Chem Res Toxicol**, 7: 526-33, 1994.

- JOHANSSON, B., PETERSEN, E.N., ARNOLD, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethyldithiocarbamic acid methyl ester. **Biochem Pharmacol**, 38: 1053-9, 1989.
- JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404, 1982.
- JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. **J Infect Dis**, 140: 984-8, 1979.
- KATIYAR, S.K., GORDON, V.R., MCLAUGHLIN, G.L., EDLIND, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, 38: 2086-90, 1994.
- KATTENBACH, W.M., PIMENTA, P.F., DE SOUZA, W., PINTO DA SILVA, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res**, 77: 651-8, 1991.
- KAVOUSHI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, 28: 19-23, 1979.
- KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 77: 487-88, 1983.
- Krulewitch, C.J. An unexpected adverse drug effect. **J Midwifery Womens Health**, 48: 67-8, 2003.
- KUŹMICKI, R., JESKE, J. Observations of the efficacy of ornidazole (Tiberall La Roche) in treatment of giardiasis. **Wiad Parazytol**, 40: 65-8, 1994.
- LANFREDI-RANGEL, A., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 85: 951-5, 1999.
- LANFREDI-RANGEL, A., KATTENBACH, W.M., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 245-51, 1999.
- LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH, W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol**, 123: 225-35, 1998.
- LEITSCH, D., KOLARICH, D., WILSON, I.B., ALTMANN, F., DUCHÊNE, M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol**, 5: 211, 2007.

- LEMÉE, V., ZAHARIA, I., NEVEZ, G., RABODONIRINA, M., BRASSEUR, P., BALLETT, J.J., FAVENNEC, L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **J Antimicrob Chemother**, 46: 819-21, 2000.
- LEVI, G.C., DE AVILA, C.A., NETO, V.A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 19: 422-4, 1977.
- LI, L., WANG, C.C. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Mol Microbiol**, 59: 202-11, 2006.
- LILL, R., KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, 25: 352-6, 2000.
- LILL, J.S., MAYS, D.C., LIPSKY, J.J. S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. **Xenobiotica**, 26: 1025-33, 1996.
- LINDMARK, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. **Exp Parasitol**, 65: 141-7, 1988.
- LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 10: 476-82, 1976.
- LINSTEAD, D.J., BRADLEY, S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 125-33, 1988.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., MITCHELL, A., HUGHES, M.N., WADLEY, R.B., EDWARDS, M.R. Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **J Appl Microbiol**, 5: 576-83, 2003.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., WADLEY, R., RALPHS, J.R., HANN, A.C., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. **Microbiology**, 148: 1349-54, 2002.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., BIAGINI, G.A., WADLEY, R.B., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, 146 12: 3109-18, 2000.
- LO, H., REEVES, R.E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 2: 23-30, 1980.
- LOEWENSON, R., MASON, P.R., PATTERSON, B.A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. **Ann Trop Paediatr**, 6: 73-8, 1986.
- LOO, T.W., CLARKE, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. **J Natl Cancer Inst**, 7: 898-902, 2000.

LÓPEZ NIGRO, M.M., PALERMO, A.M., MUDRY, M.D., CARBALLO, M.A. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. **Toxicol In Vitro**, 17: 35-40, 2003.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61: 294-304, 1997.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., BYRD, L.G., NASH, T.E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 23: 7628-33, 1996.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem**, 8: 29307-13, 1995a.

LUJÁN, H.D., MAROTTA, A., MOWATT, M.R., SCIAKY, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., NASH, T.E. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**, 3: 4612-8, 1995b.

LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., WU, J.J., LU, Y., LEES, A., CHANCE, M.R., NASH, T.E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. **J Biol Chem**, 9: 13807-13, 1995c.

LUJÁN, H.D., NASH, T.E. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. **J Eukaryot Microbiol**, 41: 169-75, 1994.

MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 161-4, 1998.

MACHADO, R.C., MARCARI, E.L., DE FÁTIMA, S., CRISTANTE, V., CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Brás. Méd. Trop**, 32: 697-704, 1999.

MADAN, A., PARKINSON, A., FAIMAN, M.D. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. **Drug Metab Dispos**, 23:1153-62, 1995.

MAJID, D.S., NISHIYAMA, A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. **Hypertension**, 39: 293-7, 2002.

MALMSTRÖM, B.G. Enzymology of oxygen. **Annu Rev Biochem**, 51: 21-59, 1982.

MEHLOTRA, R.K., TEKWANI, B.L. Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Microbes Infect**, 1: 385-94, 1999.

MORGAN, U.M., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 328-31, 1993.

MÜLLER, N., VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**, 35: 1339-47, 2005.

MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem Pharmacol**, 1; 35: 37-41, 1986.

MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, 93: 165-71, 1983.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I., QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, 35: 133-41, 2002.

NASH, T.E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 45: 585-90, 2002.

NASH, T., RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1488-92, 1998.

NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop Med Int Health**, 6: 624-34, 2001.

OBERHUBER, G., VOGELSANG, H., STOLTE, M., MUTHENTHALER, S., KUMMER, A.J., RADASZKIEWICZ, T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. **Am J Pathol**, 148: 1351-7, 1996.

OLNESS, K. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. **J Dev Behav Pediatr**, 24: 120-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Foodborne Diseases**, 2002. <disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em out, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The World Health Report**, Geneva, 1996

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R.P., DURLACHER, R., DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 621-5, 2001.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin Infect Dis**, 25: 545-9, 1997.

PAGET, T.A., RAYNOR, M.H., SHIPP, D.W., LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 63-7,

- PAGET, T.A., JARROLL, E.L., MANNING, P., LINDMARK, D.G., LLOYD, D. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol**, 135: 145-54, 1989.
- PILON-SMITS, E.A., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T., PILON, M. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. **Plant Physiol**, 130: 1309-18, 2002.
- PIMENTEL, D., COOPERSTEIN, S., RANDELL, H., FILIBERTO, D., SORRENTINO, S., KAYE, B., NICKLIN, C., YAGI, J., BRIAN, J., O'HERN, J., HABAS A., WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, 35: 653-668, 2007.
- PRITSOS, C.A., KEYES, S.R., SARTORELLI, A.C. Effect of the superoxide dismutase inhibitor, diethyldithiocarbamate, on the cytotoxicity of mitomycin antibiotics. **Cancer Biochem Biophys**, 10: 289-98, 1989.
- RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, 90: 19-39, 2003.
- RAIPULIS, J., TOMA, M.M., SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **Int J Food Microbiol**, 25: 343-7, 2005.
- REIN, A., OTT, D.E., MIRRO, J., ARTHUR, L.O., RICE, W.G., HENDERSON, L.E. Suppression of retroviral replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. **Leukemia**, 11: 106-8, 1997.
- REINER, D.S., MCCAFFERY, M., GILLIN, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol**, 53: 142-53, 1990.
- RIVAS, L., MURZA, A., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Interaction of anti-malarial drug quinacrine with nucleic acids of variable sequence studied by spectroscopic methods. **J Biomol Struct Dyn**, 18: 371-83, 2000.
- ROE, F.J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surgery**, 93: 158-64, 1983.
- SAMARAWICKREMA, N.A., BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., THAMMAPALERD, N., UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother**, 40: 833-40, 1997.
- SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 43: 1533-41, 1999.
- SAUNA, Z.E., SHUKLA, S., AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol Biosyst**, 1: 127-34, 2005.

SAUNA, Z.E., NANDIGAMA, K., AMBUDKAR, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. **J Biol Chem**, 19: 48855-64, 2004.

SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, 22: 203-8, 2006.

SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, 4: 1749-60, 2007.

SCHMIDT, H.L., STÖCKLEIN, W., DANZER, J., KIRCH, P., LIMBACH, B. Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. **Eur J Biochem**, 1: 149-55, 1986.

SCULLY, B.E. Metronidazole. **Méd. Clin. North Am**, 72: 613-21, 1988.

SHINTANI, T., KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, 5: 990-5, 2004.

SLAVIN, I., SAURA, A., CARRANZA, P.G., TOUZ, M.C., NORES, M.J., LUJÁN, H.D. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 122: 95-8, 2002.

SMITH, N.C., BRYANT, C., BOREHAM, P.F. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 18: 991-7, 1988.

STANTON, T.B., JENSEN, N.S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **J Bacteriol**, 175: 2980-7, 1993.

STOCKIS, A., DE BRUYN, S., GENGLER, C., ROSILLON, D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 40: 221-7, 2002.

STROMME, J.H. Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. **Biochem Pharmacol**, 12: 705-15, 1963.

SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., DELGADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MÜLLER, M., TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13: 10368-73, 2004.

SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 22: 2156-61, 2007.

SVÄRD, S.G., MENG, T.C., HETSKO, M.L., MCCAFFERY, J.M., GILLIN, F.D. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 30: 979-89, 1998.

TACHEZY, J., SÁNCHEZ, L.B., MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol Biol Evol**, 18: 1919-28, 2001.

TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.

TÉLLEZ, A., PALM, D., WEILAND, M., ALEMÁN, J., WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E., SVÄRD, S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. **Parasite Immunol**, 27: 163-9, 2005.

THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**, 9: 15-35, 2004.

THOMPSON, R.C. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, 32: 493-6, 2002.

THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infections disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol**, 30: 1259-1267, 2000.

THOMPSON, S.C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J Paediatr Child Health**, 30: 202-9, 1994.

THOMPSON, R.C.A, REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, 32: 71-160, 1993.

TONKIN, E.G., VALENTINE, H.L., ZIMMERMAN, L.J., VALENTINE, W.M. Parenteral N,N-diethyldithiocarbamate produces segmental demyelination in the rat that is not dependent on cysteine carbamylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1: 139-50, 2003.

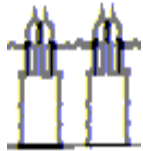
TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, 56: 173-94, 1994.

UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, 14: 150-64, 2001a.

UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Ant. Ag. Chemoth**, 45: 1810-14, 2001b.

UPCROFT, P., EDWARDS, R.M., UPCROFT, J.A., BROWN, D.M. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

- UPCROFT, J., UPCROFT, P. My favorite cell: *Giardia*. **Bioessays**, 20: 256-63, 1998.
- UPCROFT, J.A., CAMPBELL, R.W., UPCROFT, P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. **Parasitology**, 112: 309-13, 1996.
- UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol Today**, 9: 187-90, 1993.
- UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., BOREHAM, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 20: 489-96, 1990.
- VON ALLMEN, N., BIENZ, M., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Experimental infections of neonatal mice with cysts of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. **Infect Immun**, 72: 4763-71, 2004.
- WASSMANN, C., HELLBERG, A., TANNICH, E., BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **J Biol Chem**, 10: 26051-6, 1999.
- WEBSTER, B.H. Furazolidone in the treatment of giardiasis. **Am J Dig Dis**, 5: 618-22, 1960.
- WEINBACH, E.C., CLAGGETT, C.E., KEISTER, D.B., DIAMOND, L.S., KON, H. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. **J Parasitol**, 66: 347-50, 1980.
- WOLFE, M.S. Giardiasis. **N Engl J Med**, 9: 319-21, 1978.
- VOOGD, C.E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, 86: 243-77, 1981.
- WOO, P., PANAYI, G.S. Reactive arthritis due to infestation with *Giardia lamblia*. **J Rheumatol**, 11: 719, 1984.
- WOOD, Z.A., SCHRODER, E. ROBIN HARRIS, J., POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, 28: 32-40, 2003.
- WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, 2: 529-41, 2003.
- WRIGHT, C. 4TH., VAFIER, J.A., LAKE, C.R. Disulfiram-induced fulminating hepatitis: guidelines for liver-panel monitoring. **J Clin Psychiatry**, 49: 430-4, 1988.
- XIE, Z., KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9: 1102-9, 2007.
- YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 6: 30299-304, 2006.
- ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop Med Int Health**, 2: 63-82, 1997.



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

Salvador – Bahia – Brasil

2008

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO DIETILDITIOCARBAMATO EM TROFOZOÍTOS
DE *Giardia lamblia*: UMA NOVA FERRAMENTA NA TERAPIA
CONTRA A GIARDÍASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para obtenção
do grau de Mestre.

KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS

ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

**Salvador – Bahia – Brasil
2008**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A599e Anjos, Karla Graziela Santana dos
Efeitos do dietilditiocarbamato em trofozoítos de *giardia lamblia*: uma nova
ferramenta na terapia contra a giardiase [manuscrito] / Karla Graziela Santana dos. -
2008.
59 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.
Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos. Laboratório de Biomorfologia
Parasitária.

1. *Giardia Lamblia*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Dietilditiocarbamato. T. I. Título.

CDU 616.995.132:615.32

AGRADECIMENTOS

Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio durante todos estes anos.

Dra. Adriana Lanfredi Rangel

Primeiramente, pela amizade. Sua orientação na bancada foi muito importante para o desenvolvimento deste trabalho. Meu carinho por você é do tamanho do seu coração.

Msc. Cláudio Pereira Figueira

Pela amizade, incentivo e por muitas vezes me ajudar na hora do “sufoco”.

Glória Maria Maranhão Sweet

Por me acolher como uma mãe durante a realização deste trabalho. Sei que seremos eternas amigas!

Msc. Eliomara Souza Sobral Alves e Tereza Cristina Brandão

Pela amizade, companheirismo e apoio dado nos momentos difíceis.

Msc. Rafael Gomes, Diego Menezes e Alene Vanessa

Pelas discussões sobre estresse oxidativo e apoio durante todos os dias no convívio na bancada.

Elizabeth Mota Costa

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

Elisângela Sodré

Pela amizade e excelente convivência.

Síntia Sacramento, Gustavo Miranda, Antônio Fávero e Edgard Neto

Aos giardólogos e amebólogos, pelo companheirismo e apoio durante todo este tempo na bancada.

Ana Lúcia Costa, Angélica Lacerda, Danielle Anjos, Daniel de Abreu Silva, Rafael Costa,

Thiara Monteiro, Samanta Alexandrino, Fernanda Bomfim e Lourdes Neta

Pela ótima convivência no laboratório.

Msc. Mateus Santos de Sá

Pelo apoio com o experimento de citotoxicidade em linfócitos.

Dr. Jorge Clarêncio

Pelo apoio dado na citometria de fluxo.

Taise Coutinho Caíres

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo suporte dado nas pesquisas.

Todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

Todos os professores e colegas do Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa de 2006

Pelos ensinamentos e amizade.

Todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ

Minha família (Carlos, Luiza e Vinícius) e meu noivo (Ricardo)

Por vocês existirem! Amo vocês, por inteiro!

Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

Aquilo que todos os dias seria limite para nós é destinado a se tornar grande como o olhar de Nossa Senhora. Maria entendia que o conteúdo de cada condição humana desenvolve e realiza o desígnio de um Outro: não o desígnio do próprio coração, mas o do coração de Deus.

As dores, assim como a vida, certamente não lhes faltarão, mas vocês viverão a vida como um caminho; mesmo quando o caminho for fatigante, será a descoberta de um bem realmente grande.

Luigi Giussani

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A giardíase.....	01
1.2. A giardíase no Brasil.....	02
1.3. Ciclo biológico.....	03
1.4. O trofozoíto.....	07
1.5. Mecanismos de detoxificação de espécies reativas em <i>Giardia</i>	10
1.6. Tratamento da giardíase.....	11
1.6.1. Nitroimidazóis.....	11
1.6.2. Quinacrina.....	13
1.6.3. Furazolidona.....	14
1.6.4. Benzimidazóis.....	14
1.6.5. Paromicina.....	15
1.6.6. Nitazoxanida.....	15
1.6.7. Bacitracina complexada a sais de zinco.....	16
1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas.....	16
1.7. Dissulfiram: novos potenciais terapêuticos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos.....	19

4. METODOLOGIA.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Cultivo de <i>Giardia lamblia</i>	20
4.3. Ensaio de inibição.....	20
4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....	20
4.5. Detecção de tióis totais.....	21
4.6. Lipoperoxidação.....	21
4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas.....	21
4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol.....	22
4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	22
4.10. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	23
5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	25
5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i>	26
5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	28
5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31
5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	33
5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC.....	35
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	05
Figura 2	Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .	06
Figura 3	Trofozoíto de <i>Giardia</i> em seção transversal.....	09
Figura 4	Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.....	24
Figura 5	Avaliação do possível sinérgico do DETC e metronidazol em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	25
Figura 6	Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.....	27
Figura 7	Análise da expressão de tióis livres em trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	28
Figura 8	Quantificação dos grupos sulfidríla em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Figura 9	Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de <i>Giardia</i> em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 10	Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	32
Figura 11	Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 12	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	36
Figura 13	Análise ultraestrutural de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> tratados com DETC.....	37

RESUMO

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* coloniza o trato intestinal de hospedeiros vertebrados, onde é exposto a diferentes concentrações de oxigênio. Apesar do metabolismo fermentativo, trofozoítos de *Giardia* consomem oxigênio e mecanismos de detoxificação são requeridos. Desprovido de glutatona, *Giardia* expressa altas concentrações de proteínas ricas em cisteína (CRP, também conhecidas como proteínas variantes de superfície ou VSP), como defesa antioxidante. Este mecanismo envolve ciclagem redox para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido e proteção contra o estresse oxidativo. Neste contexto, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem compreender uma poderosa estratégia quimioterápica contra a giardíase. Neste estudo, nós analisamos os efeitos do dietilditiocarbamato (DETC), um inibidor de superóxido dismutase (SOD), na proliferação do parasito, expressão de tióis totais, lipoperoxidação, produção de radicais livres e arquitetura celular. DETC inibiu a proliferação celular em níveis semelhantes ao metronidazol e induziu a peroxidação de membranas neste parasito, possivelmente pelo aumento de espécies reativas. Alterações ultraestruturais também foram observadas neste protozoário. Células tratadas com DETC apresentaram alto grau de extração citoplasmática, além de estruturas indicativas de autofagia. As vesículas periféricas também se encontravam maiores, sugerindo confluência. Estes efeitos são independentes de SOD, já que *Giardia* não apresenta esta enzima. Detecção de grupos tiol com a sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA) foram significativamente moduladas negativamente pelo DETC. Estes dados nos indicam que DETC aumenta o estresse oxidativo em trofozoítos de *Giardia lamblia* pela reação com grupos tiol.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, dietilditiocarbamato, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The microaerophilic protozoan *Giardia lamblia* inhabits the upper small intestine mucosa of vertebrate hosts, where it is exposed to different concentrations of oxygen. Despite the fermentative metabolism, *Giardia* trophozoites consume O₂ and produce oxygen free radicals and therefore mechanisms for detoxification are required. Devoid of glutathione, *Giardia* express high concentrations of cysteine-rich proteins (CRP, also known as variable surface protein or VSP), as an antioxidant defense. This mechanism involves redox cycling for maintenance of a reduced intracellular environment and protection from oxidative stress. In this regard, substances that interfere in the antioxidant response of this protozoan could comprise a powerful chemotherapeutic strategy for *Giardia lamblia* infection. Here, we analyzed the effects of DETC, a superoxide dismutase (SOD) inhibitor, on parasite proliferation, thiol expression, lipid peroxidation, free radicals detection and cell architecture. DETC inhibited parasite proliferation at levels similar to metronidazole and induced peroxidation of membrane, possibly by the increase of reactive species. Ultrastructural alterations were also observed. Since this protozoan is devoid of SOD, here present data indicate SOD-independent DETC effects. Thiol groups detection with the fluorescent probe *o*-phthalaldehyde (OPA). Cells treated with DETC displayed washed out cytoplasm and structures indicative of autophagy. The peripheral vesicles also had an increased volume, presumably caused by homophilic fusion. Taken together these data indicate that DETC enhances the oxidative stress in *Giardia* trophozoites by reacting with thiol groups.

Keywords: *Giardia lamblia*, diethyldithiocarbamate, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Ceará
CO ₂	Dióxido de carbono
CRPs	Proteínas ricas em cisteína
Cu	Cobre
DETC	Dietilditiocarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT-diaforase	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
DTNB	5,5'- ditiobis- (2- ácido nitrobenzóico)
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
H ₂	Hidrogênio molecular
H ₂ DCFDA	5'- (6')- carboxi, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O	Água
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulina A
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Me	Grupamento metil
Mtz	Metronidazol
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
S	Enxofre
SH	Grupo sulfidrila
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD	Superóxido dismutase

SP	São Paulo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VSPs	Proteínas variantes de superfície
Zn	Zinco

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GIARDÍASE

A Giardíase é uma enteroparasitose causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Espécies deste gênero infestam mais de 40 espécies de hospedeiros vertebrados (Thompson, 2002; Appelbee *et al.*, 2005), que podem agir como reservatório para cepas patogênicas em humanos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). A *Giardia* apresenta duas formas evolutivas distintas, uma forma cística infectante que pode sobreviver no ambiente por meses e a trofozoíta, que prolifera intensamente na porção anterior do intestino (Adam, 2001). As manifestações clínicas da doença são diarreia aguda ou crônica (eventualmente esteatorréia), desidratação, desconforto abdominal e perda de peso (Faubert, 2000; Buret *et al.*, 2002; Müller & Von Allmen, 2005; Gascón, 2006). Artrite reativa também tem sido associada com infestações entéricas por *Giardia lamblia* (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003), bem como o status nutricional afetando função cognitiva e desenvolvimento escolar em crianças pela prevalência de doenças infecciosas intestinais (Olness, 2003).

A distribuição da giardíase é mundial, sendo a parasitose intestinal mais comum em países desenvolvidos, com taxas de detecção entre 2-5% e, 20-30% em nações em desenvolvimento (Thompson *et al.*, 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 1996 que 200 milhões de pessoas na Ásia, África e América Latina tinham sintomas de giardíase com cerca de 500.000 novos casos por ano, especialmente entre crianças. Em 2004, a giardíase foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido a sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006). Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002).

Atualmente as infecções por *G. lamblia* são controladas por drogas, sendo as mais efetivas as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 1998). Casos de resistência clínica são relatados na literatura (Townson, 1994; Farthing, 1996), com taxas de recorrência acima de 90% (Zaat *et al.*, 1997). Além disso, o metronidazol exibe potencial carcinogênico para humanos (Bendesky *et al.*, 2002). Desta forma, a identificação de novas vias parasito-específicas e desenvolvimento de novas drogas é necessário para o tratamento da giardíase.

No lúmen intestinal do hospedeiro vertebrado, *Giardia* é exposta a diferentes concentrações de oxigênio (Biagini *et al.*, 2001). Apesar do metabolismo fermentativo, *Giardia* consome O₂, produzindo radicais livres de oxigênio e a resposta imune também pode usar espécies oxidativas (Fernandes & Assreuy, 1997). Desta forma, mecanismos de detoxificação são requeridos (Brown *et al.*, 1995). Trofozoítos de *Giardia* são cobertos por proteínas ricas em cisteína (CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície), envolvidas na proteção do parasito contra os efeitos letais do oxigênio (Mehlotra & Tekwani, 1999). Além disso, estas proteínas estão associadas à resistência a proteases e à variação antigênica, sendo identificados cerca de 150 genes diferentes que codificam para as CRPs em *G. lamblia* (Nash, 2002). A enzima dissulfeto redutase está presente em *Giardia*, conferindo um balanço redox dissulfeto intracelular, ressaltando a importância da cisteína neste parasito na resposta ao estresse oxidativo. A cisteína é descrita como um fator de crescimento essencial para a *Giardia*, o que pode ser verificado no cultivo axênico (Luján & Nash, 1994; Mehlotra & Tekwani, 1999). Nesse sentido, substâncias que interfiram na resposta antioxidante deste protozoário podem constituir uma poderosa estratégia quimioterápica no parasitismo por *Giardia lamblia*.

1.2. A GIARDÍASE NO BRASIL

No Brasil, sua ocorrência é em grande parte desconhecida - principalmente em adultos. Prevalências relatadas de giardíase em crianças brasileiras variam de 14,6% em populações específicas a 78,3% em creches e crianças em idade escolar (Machado & Costa-Cruz, 1998; da Costa-Macedo *et al.*, 1998; Orlandi *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo sobre a giardíase foi realizado em Gonçalves Dias no município de Fortaleza (CE), acompanhando crianças recém-nascidas até os 4 anos de idade (Newman *et al.*, 2001). Dentre as 157 crianças, 43 (27,4%) encontravam-se infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 46% apresentaram recorrências ou recidivas. As crianças que apresentavam sintomas tiveram valores reduzidos de peso e altura, quando avaliados física e nutricionalmente.

No Hospital da Universidade Federal da Bahia, foi realizado um estudo detalhado sobre a prevalência de parasitos intestinais em 365 pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Cerca de 4,9% destes pacientes apresentaram infestação por *Giardia lamblia*, demonstrando uma prevalência significativamente aumentada quando comparada ao grupo que não apresentava a SIDA (2,4%). O grupo controle foi composto por 5243 pacientes (Feitosa *et al.*, 2001).

Machado *et al.* (1999), em um estudo sobre a incidência de giardíase em crianças de creches e escolas de ensino fundamental e médio, no município de Mirassol (SP), confirmam os dados obtidos por outros autores (Wolfe, 1978; Cardoso *et al.*, 1995; Guimarães & Sogayar, 1995) que tanto a idade (2 a 6 anos) quanto o nível sócio-econômico (até 6 salários mínimos) são fatores de risco determinantes da giardíase. Isto se dá pelo fato do nível sócio-econômico e grau de escolaridade mais baixos influenciarem as condições de higiene pessoal e cuidados com alimentos e água (Machado *et al.*, 1999). Um estudo prospectivo de doenças diarréicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para aquisição de giardíase (Guerrant *et al.*, 1983).

Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) demonstraram haver associação entre má nutrição (desnutrição energético-protéica) e o parasitismo por *Giardia lamblia* através da observação de redução significativa dos valores de peso em relação à idade e altura. Outros estudos demonstraram a relação entre infestações por *Giardia* e subnutrição na África (Loewenson *et al.*, 1986) e Ásia (Al-mekhlafi *et al.*, 2005). Ertan *et al.* (2002) também encontraram associação entre baixos níveis séricos de ferro e zinco e a giardíase.

O decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasito (Wolfe, 1978; Hill, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1999) e também com a melhoria dos hábitos de higiene pessoal associada ao aumento da idade.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

A infestação por *Giardia* ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados por fezes contendo cistos (Fig. 1), como ocorre freqüentemente em creches e orfanatos onde as condições de higiene podem estar comprometidas (Thompson, 2004). O excistamento ocorre no trato digestório, auxiliado pelo baixo pH e proteases estomacais (Adam, 2001), dando origem ao excizoíto (Bernander *et al.*, 2001). O excizoíto é oval, possui oito flagelos, quatro núcleos e metabolismo intermediário entre o trofozoíto e o cisto (Fig. 2). Possui uma ploidia total de 16N, sofrendo divisão celular por duas vezes sem replicação do DNA, gerando quatro trofozoítos com uma ploidia de 4N (Bernander *et al.*, 2001). Estes últimos irão se dividir por fissão binária e a adesão ao epitélio intestinal se dá através do disco ventral (Elmendorf *et al.*, 2003).

O encistamento ocorre com a passagem dos trofozoítos pelo lúmen intestinal, onde eles se soltam e são expostos na região posterior do intestino a um pH mais alcalino (em torno de 7,8), ácidos graxos e sais biliares (Gillin *et al.*, 1988). A ausência de lipoproteínas também demonstrou ser um fator de promoção do encistamento, o que pôde ser revertido pela adição de colesterol (Luján *et al.*, 1996).

O processo de formação da parede cística envolve a ativação dos genes de encistamento em resposta a estímulos e posterior síntese de proteínas que constituirão a parede cística (Lujan *et al.*, 1995a; 1997), as quais são transportadas para a membrana plasmática através das vesículas específicas de encistamento (ESVs) (Reiner *et al.*, 1990; Benchimol, 2004). Durante o tráfego destas proteínas, é provável que haja a participação das vesículas periféricas na maturação do material a ser secretado (Touz *et al.*, 2002a).

O potencial zoonótico desta doença tem sido considerado na literatura como um fator de relevância na transmissão peridomiciliar de felídeos e canídeos (Thompson, 2000).

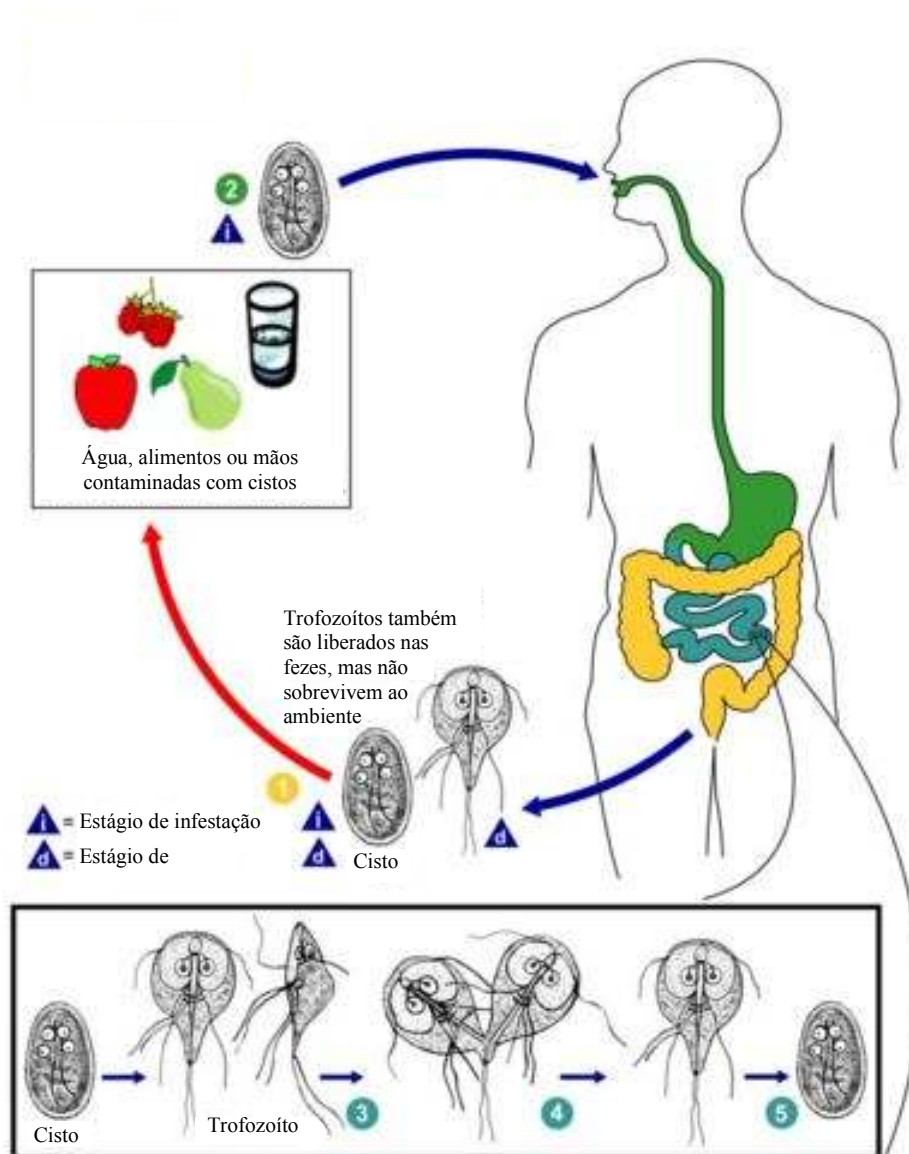


Figura 1. Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Cistos e trofozoítos eliminados através das fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Trofozoítos em processo de divisão. (5) Encistamento. Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/Giardia-lc-gif>.

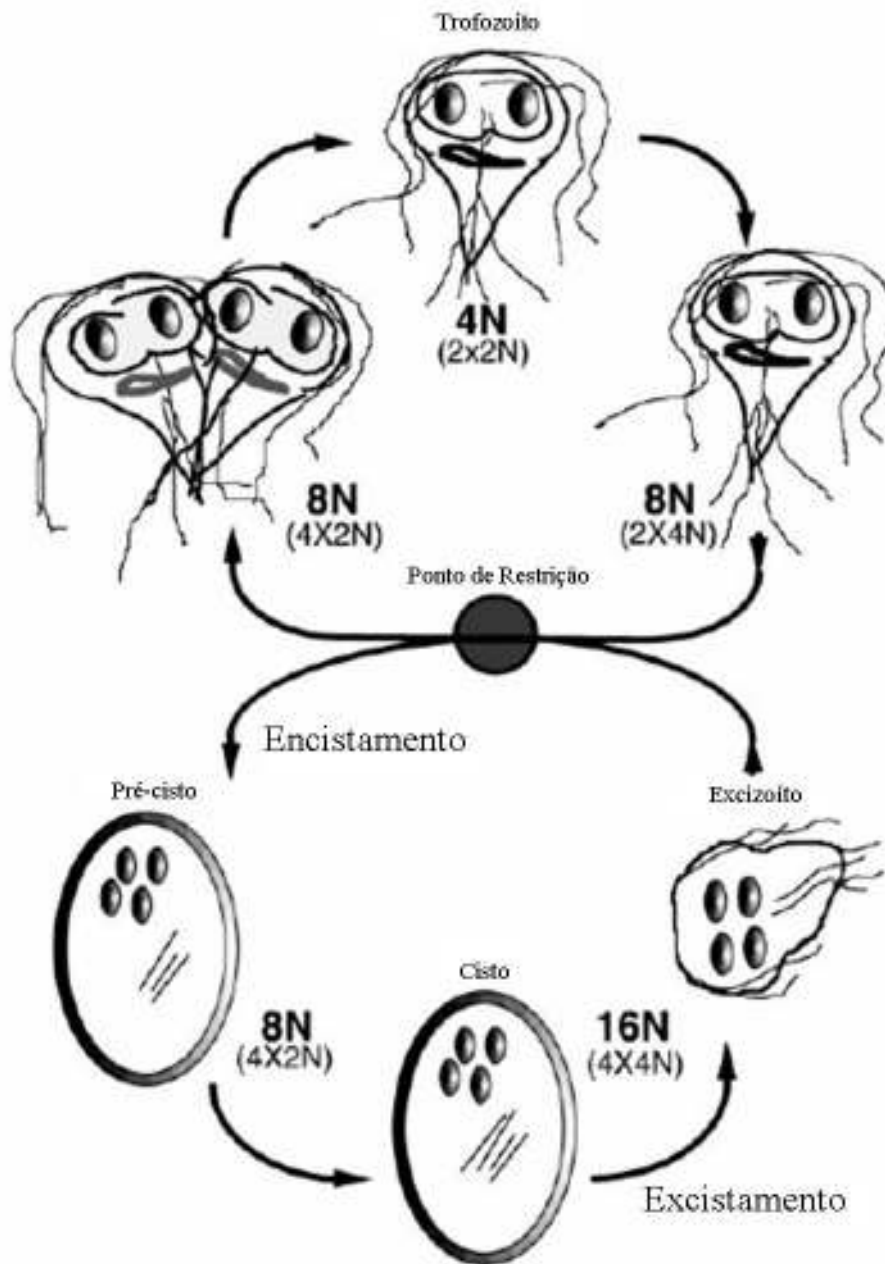


Figura 2. Ploidia do genoma em diferentes estágios do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Durante o crescimento vegetativo, a ploidia varia entre $4N$ e $8N$. Após a estimulação do encistamento e concomitante formação da parede cística, o núcleo se divide, resultando em uma célula tetranucleada com ploidia de $8N$. Subseqüente replicação do DNA gera cistos maduros, com uma ploidia celular de $16N$. O excistamento resulta na liberação de um excizoíto, que se divide duas vezes para formar quatro trofozoítos, contendo cada um dois núcleos diplóides. Adaptado de Bernander *et al.*, 2001.

1.4. O TROFOZOÍTO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* são piriformes, possuindo cerca de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. O citoesqueleto inclui um corpo mediano, quatro pares de flagelos (anterior, látero-posterior, caudal e ventral), sendo que os axonemas caudais são acompanhados pelo corpo funis e um disco adesivo é responsável pela adesão do trofozoíto às microvilosidades intestinais (Fig.3). Possui dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente e simétricos ao eixo longitudinal (Revisto por Adam, 2001). Ribossomos e grânulos de glicogênio se apresentam por todo o citoplasma e o retículo endoplasmático se projeta da região perinuclear até a região das vesículas periféricas, na região dorsal da célula (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). O complexo de Golgi torna-se visível em trofozoítos em processo de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999), mas não tem sido confirmada a presença em trofozoítos vegetativos (Gillin *et al.*, 1996). Apesar disso, mecanismos de transporte de proteínas estão presentes em *Giardia*, semelhantes aos que ocorrem na rede *trans* do aparelho de Golgi na maioria das células complexas (Gu *et al.*, 2001). Algumas evidências sugerem que trofozoítos de *Giardia* podem apresentar organela(s) com função típica de Golgi, apesar de não ter sua aparência. NBD-ceramida, um marcador do complexo de Golgi em células de mamíferos, marcou uma estrutura perinuclear tanto em trofozoítos vegetativos, quanto em células em processo de encistamento (Luján *et al.*, 1995b; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

As vesículas periféricas são caracterizadas pela acidez dos seus compartimentos, como demonstrado através da incorporação de laranja de acridina (Feely *et al.*, 1991; Kattenbach *et al.*, 1991), bem como pela concentração de ferritina exógena e lucifer yellow, sugerindo seu papel na endocitose (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Os vacúolos contêm uma variedade de enzimas com atividade hidrolásica, como por exemplo, a fosfatase ácida, proteases e RNase, indicando suas características lisossomais (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). É provável que ocorra maturação destes vacúolos de endossoma inicial, tardio até lisossomo, processo que pode estar funcionalmente associado ao retículo endoplasmático (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Apesar de *Giardia* não possuir mitocôndria, a presença de membranas especializadas com função transportadora de elétrons tem sido detectada (Lloyd *et al.*, 2002). Conhecidas como mitossomos, estas organelas são responsáveis pela produção de H₂ e apresentam maquinaria protéica para biossíntese de centros Fe-S (Tachezy *et al.*, 2001). Em eucariotos, este processo ocorre exclusivamente em organelas limitadas por dupla membrana, como mitocôndria (Lill & Kispal, 2000), hidrogenossomos (Sutak *et al.*, 2004) e cloroplastos (Pilon-Smits *et al.*, 2002).

Peroxisomos, que são organelas citoplasmáticas responsáveis por reações oxidativas, estão ausentes neste parasito.

Os proteassomos de *Giardia* apresentam muitas similaridades com os de Archaea (Emmerlich *et al.*, 1999). Além disso, proteínas alvo de proteassomos são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar presente neste protozoário como um gene de cópia única, o que o distingue dos outros eucariotos, que possuem múltiplas cópias desse gene (Emmerlich *et al.*, 2001).

Cerca de 30% dos trofozoítos apresentam uma protrusão ventral que emerge da região central do disco adesivo. A observação desta estrutura revelou a presença de cisternas de retículo endoplasmático, muitas vezes formando membranas concêntricas envolvendo quantidades variadas de grânulos de glicogênio, possivelmente em processo de degradação, além de vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999).

A flange ventrolateral é uma projeção citoplasmática maleável, semelhante a lamelipódios, localizada entre as regiões de superfície ventral e dorsal e que se ajusta as microvilosidades das células epiteliais durante a adesão (revisto por Adam, 2001).

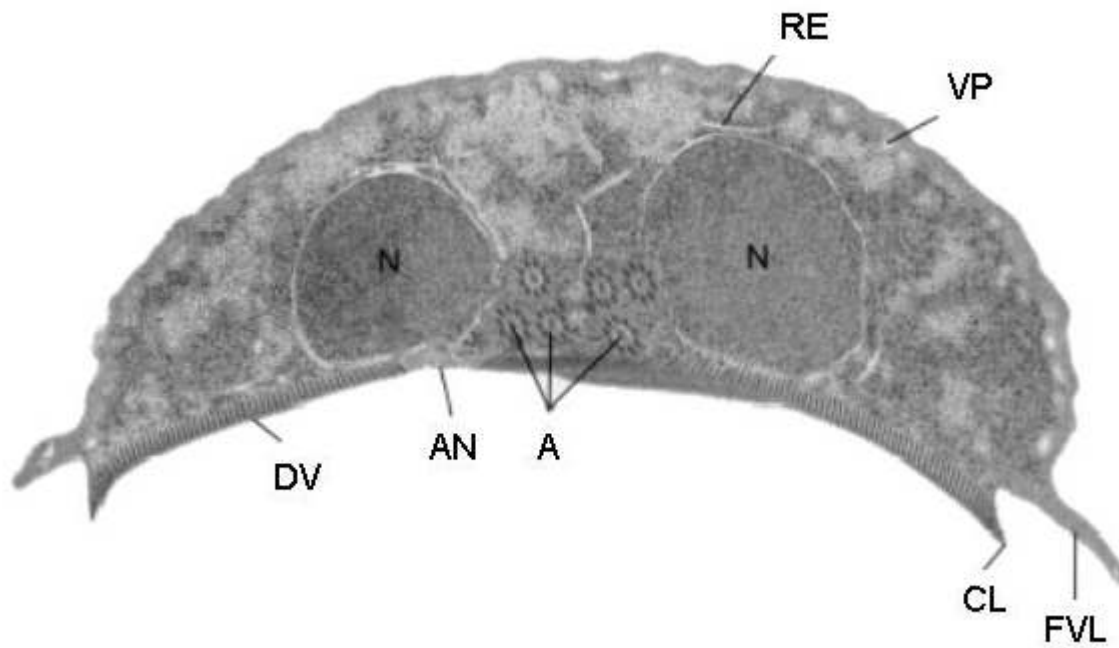


Figura 3. Trofozoíto de *Giardia* em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Adaptado de Adam, 2001.

1.5. MECANISMOS DE DETOXIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM *Giardia*

Apesar de não possuir mitocôndria, *Giardia* consome oxigênio e os produtos finais do seu metabolismo de glicose são sensíveis às tensões de O₂ presentes no lúmen intestinal. Em um ambiente anaeróbico, etanol, alanina e dióxido de carbono (CO₂) são formados em concentrações equimolares. Contudo, quando o oxigênio é introduzido, o balanço de carbono é radicalmente alterado. A produção de alanina é reduzida em cerca de 90% e a produção de acetato é simultaneamente aumentada em cerca de dez vezes. A concentração de CO₂ é aproximadamente duas vezes aumentada, mas a produção de etanol não é alterada (Paget *et al.*, 1990). A capacidade de respirar de alguns protozoários anaeróbicos sugere que eles são capazes de transferir elétrons ao oxigênio como seu acceptor final. Contudo, seu metabolismo permanece fermentativo, mesmo em condições aeróbicas. A utilização de O₂ por *Giardia lamblia* não é afetada por inibidores de respiração mitocondrial, mas bloqueada por flavo-antagonistas, inibidores de tiol e quelantes de metal (Weinbach *et al.*, 1980), sugerindo que algumas das flavoproteínas, tioproteínas e metaloproteínas podem usar O₂ como acceptor de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio neste parasito.

Os mecanismos de detoxificação de espécies oxidativas neste parasito incluem a atividade citoplasmática de uma oxidase flavina-dependente (NADH oxidase), que reduz tetravalentemente O₂ em H₂O, além de estar envolvida em mecanismos de resistência ao metronidazol de algumas cepas, que expressam altos níveis de atividade desta enzima (Ellis *et al.*, 1993). A susceptibilidade de *Giardia lamblia* ao oxigênio também é justificada pela presença da DT-diaforase, uma enzima que tem sua atividade acompanhada pelo aumento intracelular de peróxido de hidrogênio (Li & Wang, 2006). A NADH peroxidase, localizada na região transmembrana de *Giardia lamblia*, catalisa a formação de água a partir de peróxidos (Brown *et al.*, 1995).

Um importante mecanismo de proteção contra o ambiente hostil ao qual *Giardia* é submetido no intestino está relacionado a um ambiente redutor produzido pelas CRPs, que apresentam de 11 a 12% de cisteína e são expressas em *Giardia lamblia* em concentrações milimolares (Luján & Nash, 1994). A cisteína é o principal tiol de baixo peso molecular neste parasito, mas baixos níveis de sulfito, ácido tioglicólico e coenzima A também foram observados, enquanto que glutatona e seus intermediários não foram detectados (Brown *et al.*, 1993). Além disso, subsequente identificação de uma dissulfeto redutase (semelhante à tioredoxina redutase), que utiliza cistina como acceptor primário de elétrons em *Giardia*, parece ser o maior sistema de atividade redox tiol-dissulfeto contra o estresse oxidativo neste protozoário (Brown *et al.*, 1996b).

Pesquisas em dados de base genômicas em *G. lamblia* revelaram também homólogos de tioredoxinas peroxidases que, se expressadas, podem proteger organismos dos radicais livres de oxigênio pela redução de peróxidos com os elétrons da tioredoxina (Wood *et al.*, 2003).

Algumas das enzimas reconhecidamente envolvidas na detoxificação de radicais livres de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), que dismuta o superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é transformado em água pela catalase, não estão presentes em *Giardia*, sugerindo a importância dos grupamentos tiol na sobrevivência deste parasito (Brown *et al.*, 1995).

Mais recentemente, Biagini e colaboradores (2001) descreveram o potencial antioxidante do piruvato em *Giardia*, transformando não enzimaticamente superóxido e peróxido de hidrogênio em acetato e CO₂.

Uma importante estratégia do parasito *G. lamblia* contra a defesa do hospedeiro durante a colonização da mucosa intestinal se dá através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase epitelial, por uma competição pela arginina, utilizada como fonte de energia pelo parasito. O NO apresenta propriedades citostáticas contra *Giardia* e o bloqueio de sua produção, conseqüentemente, permitirá a sua proliferação (Eckmann *et al.*, 2000).

Morte de trofozoítos de *Giardia lamblia* por macrófagos murinos ativados ocorreu rapidamente *in vitro* (Fernandes & Asseruy, 1997), com 60% dos parasitos sendo eliminados em cerca de 2 horas. Um inibidor de NO sintase, *N*-iminoetil-1-ornitina, protegeu os organismos. A extrema sensibilidade deste parasito ao estresse nitrosativo é principalmente devida à interrupção de funções da membrana plasmática, e perda da capacidade do consumo de O₂ em associação com a diminuição da atividade flagelar (Lloyd *et al.*, 2003).

1.6. TRATAMENTO DA GIARDÍASE

1.6.1. Nitroimidazóis

Os agentes da classe dos nitroimidazóis utilizados para tratamento de infecções por *Giardia* incluem o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. O metronidazol foi primeiramente relatado para o tratamento da tricomoníase (Durel *et al.*, 1960), sendo posteriormente indicado para uso terapêutico na giardíase (Darbon *et al.*, 1962). Desde então, a síntese e testes biológicos de outros compostos nitroimidazóis têm sido uma crescente, aumentando o arsenal terapêutico contra protozoários e bactérias anaeróbicas (Scully, 1988;

Boreham, 1991; Upcroft & Upcroft, 2001a; Harder, 2002). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (Raether & Hänel, 2003).

Dos nitroimidazóis, o mecanismo de ação do metronidazol tem sido o mais amplamente estudado. A ativação da droga se dá através da redução do seu grupo nitro pela piruvato: ferredoxina oxidoredutase (Townson *et al.*, 1994; Samuelson, 1999), e um gradiente favorecendo o transporte intracelular do metronidazol é estabelecido por esta reação de redução. A atividade antimicrobiana deste composto reduzido resulta da reatividade e dismutação de intermediários instáveis, que matam os trofozoítos através da interação com várias moléculas essenciais como o RNA, DNA, proteínas e componentes de membrana, resultando em danos celulares irreversíveis (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988; Freeman *et al.*, 1997). Além destes efeitos, o metronidazol inibe o consumo de O₂ do trofozoíto, por agir como um aceptor de elétrons alternativo (Paget *et al.*, 1989). Apesar de este composto ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, ele se mostra ineficaz contra os cistos, provavelmente pela dificuldade em ultrapassar a barreira imposta pela parede cística (Thompson *et al.*, 1993).

Os efeitos colaterais relacionados ao uso do metronidazol incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (Levi *et al.*, 1977; Kavousi, 1979). Além disso, a inibição da aldeído desidrogenase por esta droga pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), pela ingestão de álcool durante o período de tratamento (Gardner & Hill, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos em altas doses por longos períodos tem sido relatado na literatura (Lindmark & Muller, 1976; Voogd, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (Bendesky *et al.*, 2002). O uso prolongado deste fármaco, falhas no tratamento e má conduta terapêutica tem aumentado os níveis de resistência clínica em pacientes parasitados por *Giardia lamblia*. Na França, mais de 20% dos casos de giardíase apresentam algum grau de resistência à droga (Lemeé *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001b).

Evidências clínicas em adultos e pacientes pediátricos têm demonstrado a eficácia e segurança do tinidazol no tratamento contra a giardíase, podendo ser usado em casos onde houve falhas no tratamento com o metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007). Apesar dos efeitos adversos relatados pelo uso deste fármaco, a exemplo de gosto amargo na boca, vertigem e perturbações intestinais, estes não são tão comuns como os causados pela utilização do metronidazol (Jokipii & Jokipii, 1979; 1982).

Um outro derivado dos 5-nitroimidazóis que é uma boa alternativa para o tratamento da giardíase é o ornidazol. Apesar dos poucos estudos realizados, este fármaco apresenta uma

excelente eficácia, comparável ao tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1982; Bassily *et al.*, 1987; Kuzmicki & Jeske, 1994). Em um estudo *in vitro*, efeitos genotóxicos e citotóxicos causados pelo ornidazol em culturas de sangue periférico humano foram sugeridos (López *et al.*, 2003). Apesar disso, efeitos colaterais raramente ocorrem em pacientes que fazem uso deste fármaco via oral (Escobedo & Cimerman, 2007).

O secnidazol também apresenta uma boa eficácia contra a giardíase, sendo rápida e completamente absorvido por via oral. Assim como o tinidazol e o ornidazol, este composto apresenta uma meia-vida longa (17-29 horas), o que permite a administração em dose única com concomitante diminuição dos efeitos colaterais em relação ao metronidazol (Gillis & Wiseman, 1996). Efeitos adversos têm sido relatados, a maioria notavelmente relacionada a distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.2. Quinacrina

A quinacrina é um derivado de acridina que foi primeiro introduzido como agente antimalárico em 1930. Somente em 1937 a eficácia deste composto foi demonstrada contra *Giardia*. Por muitos anos a quinacrina foi a droga de escolha no tratamento da giardíase, sendo substituída na década de 60 pelo metronidazol (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação deste fármaco no parasito não está completamente elucidado. A diminuição do consumo de oxigênio pela interferência com componentes flavina de enzimas como a NADH oxidase (Paget *et al.*, 1989) e inibição da síntese de ácidos nucléicos pela ligação ao DNA (Rivas *et al.*, 2000) são proposições feitas para o modo de ação desta droga. Após administração oral, a quinacrina é totalmente absorvida pelo trato intestinal, mesmo em pacientes com diarreia severa. Sua meia-vida é longa, sendo vagarosamente excretado pelos tecidos.

A toxicidade seletiva da quinacrina se deve ao fato de que a taxa de incorporação da droga no parasito é maior do que nas células do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). Este fármaco é eficaz contra cistos e também promove a redução do excistamento *in vitro*. Resistência induzida em culturas por quinacrina tem sido demonstrada, estando relacionada a uma diminuição da taxa de incorporação desta droga pelo protozoário (Upcroft *et al.*, 1996).

Efeitos colaterais deste fármaco incluem dor de cabeça, náusea, vômitos, gosto amargo na boca e coloração amarelada ou alaranjada na pele e urina (Harris *et al.*, 2001). Outros efeitos relatados são hemólise em pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, psicose tóxica e exacerbação da psoríase (Gardner & Hill, 2001).

1.6.3. Furazolidona

Este derivado de nitrofurano foi descoberto em 1940, mas só em 1960 foi relatada sua atividade contra *Giardia lamblia* (Webster, 1960). Sua eficácia é menor do que a do metronidazol e quinacrina, porém sua grande vantagem consiste em sua formulação líquida, o que facilita a administração desta droga, principalmente em crianças (Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de ação da furazolidona consiste na redução do seu grupo nitro pela NADH oxidase, cujos radicais citotóxicos causam danos aos componentes celulares, incluindo o DNA (Brown *et al.*, 1996a). Resistência está relacionada à diminuição das taxas de incorporação da droga pelo parasito e aumento dos níveis de enzimas com ciclagem tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 1993).

Cerca de 10% dos pacientes relatam sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarreia. Podem também ocorrer reações semelhantes às causadas pelo dissulfiram após ingestão de álcool (Gardner & Hill, 2001). Efeitos mutagênico em bactérias e carcinogênico em ratos e camundongos têm sido relatados na literatura decorrentes do uso da furazolidona (Raipulis *et al.*, 2005).

1.6.4 Benzimidazóis

Inicialmente reconhecidos como drogas antihelmínticas, os benzimidazóis possuem um amplo espectro de ação, inclusive contra alguns protozoários (Escobedo & Cimerman, 2007). Dois membros dessa classe são utilizados no tratamento da giardíase, o albendazol e o mebendazol. Eles exercem seus efeitos pela ligação à β -tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e falhas na incorporação de glicose também ocorrem (Gardner & Hill, 2001). Cacopardo *et al.* (1995) demonstraram que a combinação albendazol-metronidazol foi 100% eficaz em portadores de *G. lamblia* resistente ao metronidazol. Uma outra vantagem relacionada ao uso do albendazol é a relativa falta de efeitos colaterais. A OMS recomenda que mulheres em período gestacional só recebam tratamento com albendazol e mebendazol a partir do terceiro mês de gestação (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.5. Paromicina

A paromicina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem sido uma alternativa eficaz e menos tóxica para gestantes infectadas por *Giardia* e em caso de cepas resistentes (Hill, 1993). O mecanismo de ação proposto para este fármaco é através da inibição da síntese protéica, interferindo nas subunidades ribossomais do parasito, que possuem tamanhos e seqüências incomuns (Katiyar *et al.*, 1994).

Após administração oral, pouco da droga é absorvida pela circulação sistêmica, atingindo altas concentrações no intestino. A maior parte da paromicina é excretada nas fezes. Em pessoas com disfunção nos rins, este fármaco pode se acumular e causar toxicidade renal (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.6.6. Nitazoxanida

A nitazoxanida é um 5-nitrotiazol que possui amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias, protozoários e helmintos. Estudos clínicos e *in vitro* têm confirmado a eficácia da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, no tratamento da giardíase. O mecanismo de ação é semelhante à classe dos 5-nitroimidazóis, através do grupo nitro (Adagu *et al.*, 2002). A absorção e bioviabilidade desta droga são aumentadas pela administração conjunta com alimentos (Stockis *et al.*, 2002). Uma vez fracamente absorvido pelo trato gastrointestinal, dois terços deste fármaco são expelidos pelas fezes e um terço pela urina (Broekhuysen *et al.*, 2000). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais.

1.6.7 Bacitracina complexada a sais de zinco

Este fármaco é composto de dois agentes: a bacitracina, um antibiótico produzido pela cepa Tracy-1 de *Bacillus subtilis*, e zinco, que promove estabilidade a este composto. Efeitos colaterais da bacitracina complexada a sais de zinco foram notados somente em um pequeno

número de pacientes e incluem diarreia, náusea e desconforto abdominal. O uso prolongado desta droga causa problemas nefrotóxicos e distúrbios gastrointestinais (Gardner & Hill, 2001).

1.6.8. Necessidade de novas abordagens quimioterápicas

O emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inapropriadas, os baixos custos e a facilidade de obtenção de determinados fármacos têm ocasionado resistência e feito com que em muitas partes do mundo, drogas como a cloroquina, penicilina e a meticilina sejam novamente utilizadas no tratamento de doenças ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Upcroft & Upcroft, 2001a).

Uma recente revisão do grupo dos Upcroft aponta a necessidade do desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento não apenas da giardíase, como também para a amebíase e outras protozooses (Wright *et al.*, 2003).

A busca de novos fármacos para uso no combate a parasitoses intestinais vem sendo considerável. No que concerne a giardíase, diferentes drogas têm sido utilizadas, mas nenhuma é plenamente satisfatória, principalmente pela alta incidência de efeitos colaterais que justificam as contra-indicações e ocorrência significativa de falhas no tratamento. Nesse sentido, é de fundamental importância a realização de novas pesquisas em estratégias terapêuticas para a giardíase, tornando-se uma área de desenvolvimento em potencial nos próximos anos (Escobedo & Cimerman, 2007).

1.7. DISSULFIRAM: NOVOS POTENCIAIS TERAPÊUTICOS

O dissulfiram, ou tetraetiltiuram dissulfeto, tem sido usado por mais de meio século para terapia de aversão ao álcool, através da inibição da enzima hepática aldeído desidrogenase (ALDH) (Sauna *et al.*, 2005). Sua farmacocinética tem sido extensivamente estudada, sendo considerada pela FDA e OMS uma droga segura e eficaz. Nesta última década numerosos relatos vêm sugerindo a utilização deste fármaco no tratamento do câncer e infecções fúngicas (Sauna *et al.*, 2005). A reversão do fenótipo MDR (Resistência a Múltiplas Drogas) pela inibição dos transportadores ABC, através de sua ligação com um de seus membros, a P-glicoproteína (Pgp) (Loo & Clarke, 2000; Sauna *et al.*, 2004), e seus poucos efeitos colaterais, mesmo em uso prolongado (Brewer, 1984; Chick, 1999; Brar *et al.*, 2004) fazem do dissulfiram uma droga com múltiplos alvos terapêuticos em potencial.

Recentes estudos do mecanismo pelo qual o dissulfiram exerce seus efeitos anti-álcool tem fornecido evidências para a formação de um intermediário reativo que é um potente agente carbamilante para grupos sulfidrila (Madan *et al.*, 1995). No organismo, esta droga é rapidamente e completamente reduzida a dietilditiocarbamato (DETC) (Cobby *et al.*, 1977), um conhecido inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (SOD) (Guzik *et al.*, 2005) e que forma conjugados com a *N*-acetilcisteína (NAC) (Hu *et al.*, 1997). O DETC já teve sua atividade relatada para vários protozoários parasitas, a exemplo de *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* e algumas espécies do gênero *Plasmodium* (Giulivi *et al.*, 1988; Bouma *et al.*, 1998; Deharo *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O protozoário microaerófilo *Giardia lamblia* possui uma larga distribuição mundial, causando síndrome da má absorção, perturbações intestinais, com dores abdominais, eliminação de fezes diarréicas e eventualmente esteatorréia. Artrite reativa também tem sido relacionada ao parasitismo por *G. Lamblia*. (Woo & Panayi, 1984; Hill Gaston & Lillicrap, 2003). Vários relatos têm associado a prevalência de doenças infecciosas intestinais e status nutricional afetando ainda mais a função cognitiva, aproveitamento escolar e desenvolvimento físico de crianças (Olness, 2003).

Em países em desenvolvimento, cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em ambientes com falta de saneamento básico, o que aumenta as taxas de prevalência nestes locais, chegando em torno de 30%, sugerindo que existam perto de 1 bilhão de casos de giardíase (OMS, 1998 *apud* Wright *et al.*, 2003), contribuindo para os 2,1 milhões de mortes anuais por doenças diarréicas (OMS, 2002). Em 2004, *Giardia* foi incluída na Iniciativa de Doenças Negligenciadas pela OMS, devido à sua estreita relação com condições sócio-econômicas (Savioli *et al.*, 2006).

Doenças diarréicas são a causa principal de morbidade na maioria dos países em desenvolvimento (Pimentel *et al.*, 2007). A este respeito, o advento de novas drogas seguras e eficazes na terapia contra a giardíase, aliado a programas preventivos em regiões endêmicas para esta doença, poderiam reduzir consideravelmente os custos com o tratamento (Savioli *et al.*, 2006). Os impactos sócio-econômicos oriundos de políticas que promovem a saúde pública incluem uma melhor formação de recursos humanos, pela melhora do desenvolvimento cognitivo de crianças, com concomitante aumento na geração de postos de trabalho. Por consequência, haveria uma melhora na qualidade de vida da população.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Nosso trabalho tem como objetivo geral o estudo do mecanismo de ação do dietilditiocarbamato (DETC) em trofozoítos de *Giardia lamblia*, objetivando uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais no tratamento contra a giardíase.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinação da suscetibilidade parasitária (IC_{50}) através de ensaios de proliferação.
- 2) Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos.
- 3) Avaliação dos danos oxidativos celulares, por quantificação bioquímica da peroxidação lipídica induzida pelo DETC.
- 4) Quantificação colorimétrica de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*.
- 5) Análise por microscopia para localização da expressão de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*, através de sonda fluorescente.
- 6) Detecção de radicais livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*, pelo uso de sonda fluorescente.
- 7) Elucidação dos efeitos microbicidas do fármaco por microscopia eletrônica de transmissão, para a observação da ultraestrutura celular do parasito, possivelmente permitindo a compreensão do modo de ação do composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2. Cultivo de *Giardia lamblia*

A cepa de *G. lamblia* a ser utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof^º. Dra. Frances D. Gillin, do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB são axenicamente cultivados em tubos cônicos de vidro (aproximadamente 10 mL), em meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina e 10% (volume/volume) de soro bovino inativado a 56°C por uma hora (Keister, 1983), à temperatura de 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 a 72 horas.

O meio TYI-S-33 é preparado com a seguinte composição: 19,5 mg/mL de caseína, 10,5 mg/mL de extrato de levedura, 10 mg/mL de dextrose, 2 mg/mL de cloreto de sódio, 0,6 mg/mL de fosfato de potássio monobásico, 1 mg/mL de fosfato de potássio dibásico, 2 mg/mL de L-cisteína, 1 mg/mL de bile bovina e 0,2 mg/mL de ácido ascórbico. O pH é ajustado a 7,2 com hidróxido de sódio 1N. O meio é esterilizado em filtro a vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

4.3. Ensaio de inibição

Inóculos de 1 a 2 x 10⁵ trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DETC e/ou metronidazol, por 24 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos

Inóculos de 1 x 10⁶ esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 µL de [³H]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1 µCi/poço, em presença ou ausência do

fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5. Detecção de tióis totais

Inóculos de 2×10^4 trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em tubos de 15 mL por 60-72 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC e/ou metronidazol. Em seguida as células foram centrifugadas a 500 X g por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM, pH 8,2. A 20 μ L da amostra foram adicionados 75 μ L do mesmo tampão, 25 μ L do reagente DTNB e 400 μ L de metanol, sendo após centrifugado a 1500 X g por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

4.6. Lipoperoxidação

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC e/ou N-acetilcisteína (NAC). Os parasitos foram lavados duas vezes por centrifugação a 500 X g por 10 minutos em salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2. Após centrifugação, 200 μ L de 0,1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) foram adicionados a 200 μ L de células em suspensão e incubados a 100°C por 3 horas. A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida a 532 nm e a absorbância foi comparada ao padrão obtido usando 0.1% TBA e PBS, à proporção de 1:1.

4.7. Microscopia de fluorescência para detecção de espécies reativas

Trofozoítos cultivados como descrito acima foram tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca/Mg, pH 7,2 por centrifugação a 500 X g por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo 25 μ M da sonda 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes). Após o período de incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes, montados em lâminas e observados ao microscópio de fluorescência.

4.8. Microscopia de fluorescência para detecção de grupos tiol

Trofozoítos foram fixados por 30 min a 4°C em 1% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Para a adesão dos trofozoítos, as lamínulas foram lavadas com extran neutro, submersas em etanol 70% e secas sem contato manual. Foram colocadas em placas de Petri de 11 cm de diâmetro e recobertas com solução de 0,1 % de poli-*L*-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos. Retirado o excesso desta solução, as lamínulas foram secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e, novamente, secas. As células aderidas por 30 minutos às lamínulas foram incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propilgalato e observadas no microscópio de fluorescência.

4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após o tratamento com as drogas, as células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio neste tampão. Em seguida os parasitos foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de acetona e infiltrados em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por 48 hs a 60°C, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 400 e contrastados em 5% de acetato de uranila e 15% de citrato de chumbo. As grades são observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.10. Análise estatística

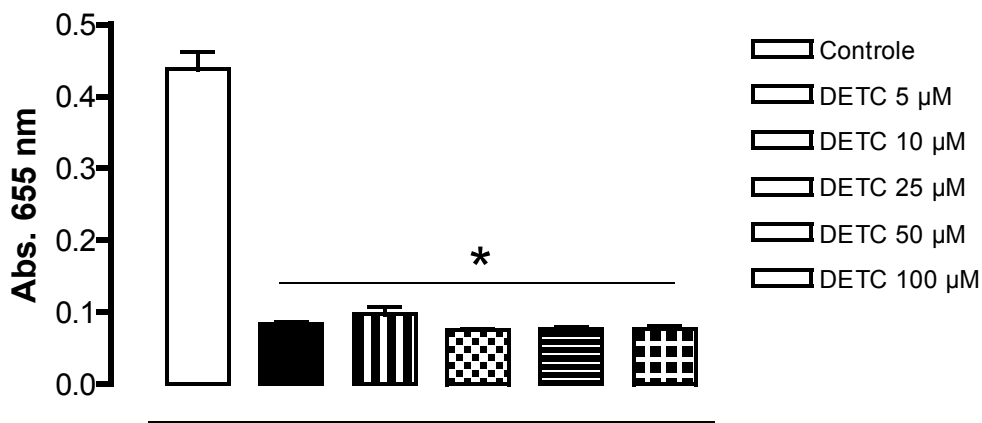
Os dados obtidos estão representados como a média ± desvio padrão da média e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito inibitório do DETC na proliferação de trofozoítos de *G. lamblia*

Para avaliar a atividade inibitória do DETC na proliferação celular de *G. lamblia*, nós realizamos experimentos de dose-resposta, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μM , por 24 horas. O DETC diminuiu significativamente a proliferação dos trofozoítos, não havendo diferença significativa entre as concentrações utilizadas, presumivelmente por uma ausência de efeito giardicida dose-dependente nestas concentrações (Fig. 4A). O valor de IC_{50} do DETC foi aproximadamente de 2,0 μM , o que demonstra a efetividade do DETC contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, tendo seu efeito comparado ao metronidazol, com valores de IC_{50} em torno de 1,5 μM . Apesar de discreto, aparentemente há uma relação de dose-dependência para o efeito inibitório do metronidazol neste parasito nas concentrações utilizadas (Fig. 4B).

(A)



(B)

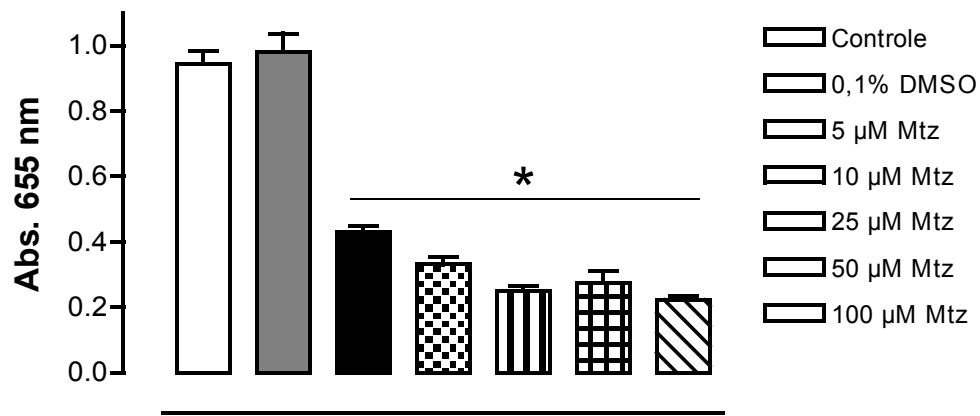


Figura 4. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular. Trofozoítos de *Giardia lamblia* expostos a diferentes concentrações de DETC e metronidazol. **(A)** Após 24 horas de incubação, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com DETC, porém o efeito não foi dose-dependente nas concentrações testadas. **(B)** Em células tratadas com o metronidazol, observamos uma inibição significativa do crescimento em comparação com as células tratadas com 0,1% de DMSO, havendo uma redução dose-dependente discreta na proliferação entre 5 25 µM de concentração da droga. (*, $p < 0,001$).

5.2. Efeito da associação do DETC com o metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação da concentração inibitória do DETC e metronidazol neste protozoário, nós avaliamos a associação de ambas as drogas para verificar um possível efeito sinérgico em trofozoítos de *G. lamblia*. Em células tratadas com 1 μM de DETC por 24 horas, não houve uma inibição significativa do crescimento, bem como em parasitos tratados com 1 μM de metronidazol, nas mesmas condições (Fig. 5). Quando nós fizemos as associações do DETC com o metronidazol, em diferentes concentrações de ambas e em um mesmo período de incubação, verificamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e algumas combinações, especialmente quando a concentração do metronidazol está acima de 0,5 μM , o que não ocorre quando comparamos estas combinações com o DETC ou metronidazol isoladamente (Fig. 5). Estes resultados sugerem que não há um efeito sinérgico entre estes compostos em trofozoítos de *Giardia lamblia* nas concentrações utilizadas, já que os valores de IC_{50} de ambas as drogas se encontram próximos aos valores empregados experimentalmente neste estudo.

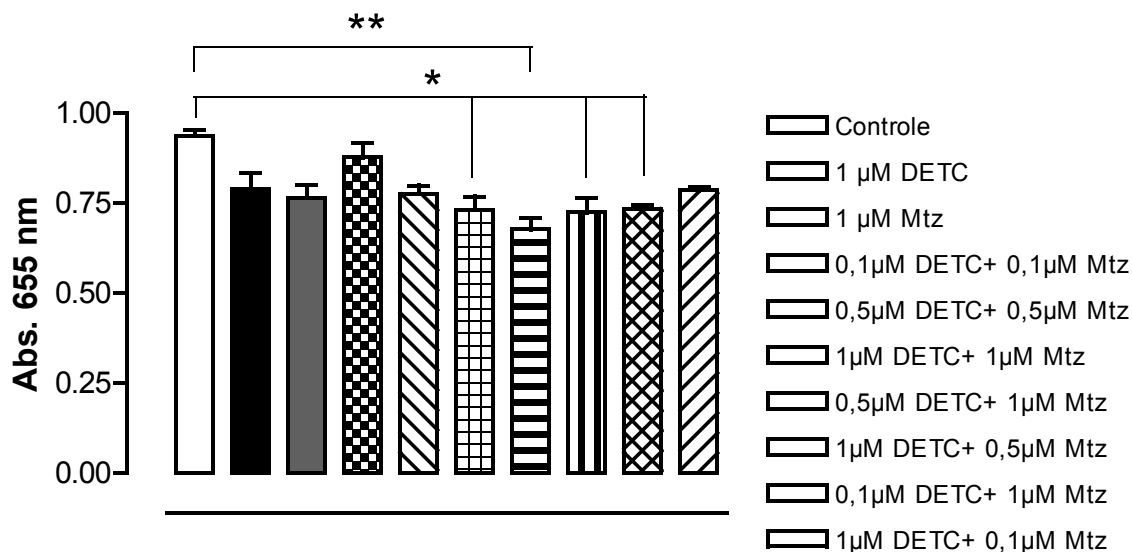
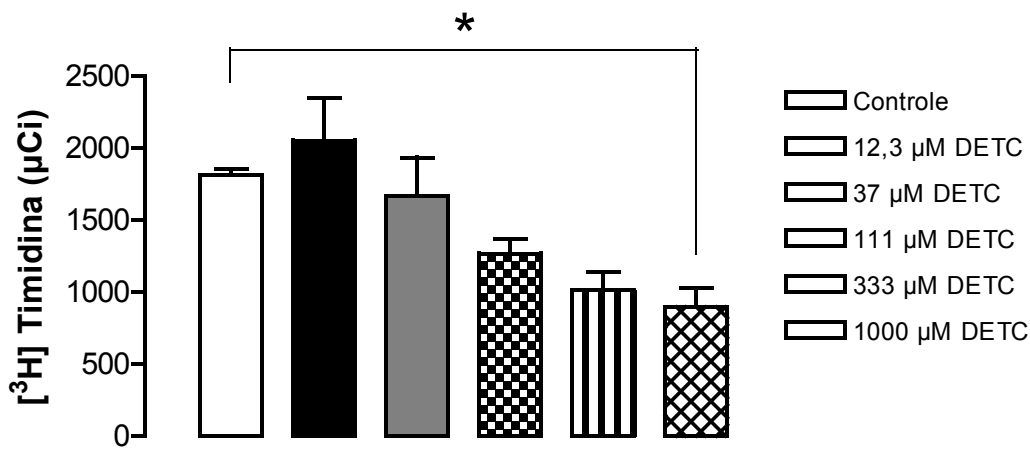


Figura 5. Avaliação de possível sinergismo entre DETC e metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*. As células foram incubadas com ambas as drogas em diferentes combinações ou isoladamente, por 24 horas. Houve uma inibição estatisticamente significativa (* $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) da proliferação celular em parasitos tratados com concentrações mais elevadas de ambas as drogas, porém os resultados não indicam efeito sinérgico desta associação.

5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos do DETC em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com DETC, verificamos uma diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Fig. 6A). O valor de IC₅₀ para este composto em esplenócitos foi cerca de 217 µM, muito acima dos valores encontrados para seu efeito giardicida. O metronidazol não causou citotoxicidade em esplenócitos (Fig. 6B) nas mesmas concentrações utilizadas para o DETC, sugerindo que estas células são menos suscetíveis à ação do 5-nitroimidazol em comparação ao tiocomposto. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o DETC causa seu efeito citotóxico em células do baço difere significativamente do utilizado para ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

(A)



(B)

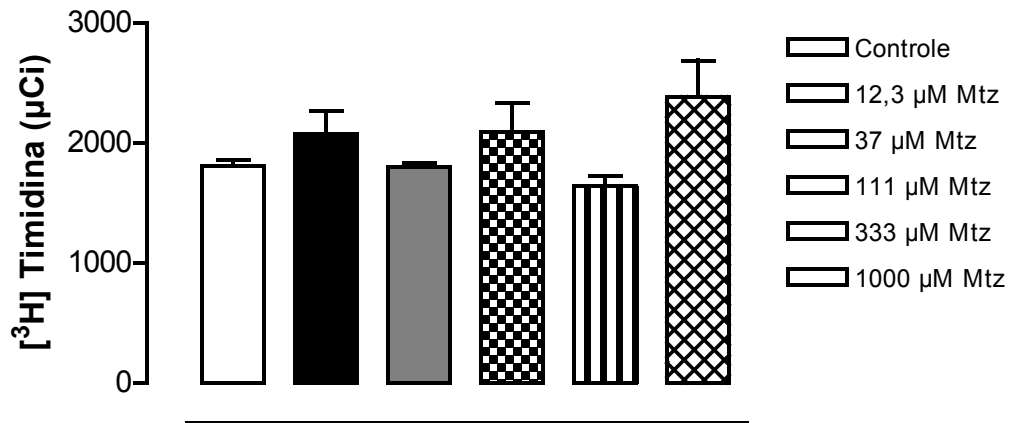


Figura 6. Determinação da citotoxicidade em culturas de esplenócitos. Células do baço de camundongos Balb/C foram tratadas com DETC (A) ou metronidazol (B), por 24 horas. Houve uma redução da taxa de proliferação dos esplenócitos tratados com DETC, indicada pela redução da incorporação de timidina com o aumento da concentração da droga. (* $p < 0,05$). O metronidazol não reduziu a incorporação de timidina destas células, nas mesmas concentrações.

5.4. Detecção de tióis livres em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para verificar os possíveis efeitos causados pelo DETC neste parasito, testamos se a atividade giardicida desta substância está associada com o conteúdo dos tióis livres através da detecção pela sonda fluorescente *o*-phthaldialdeído (OPA), que se liga seletivamente a grupos tiol em presença de grupamentos amino. Em parasitos controle foi observada uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de algumas células (Fig. 7A). Em parasitos tratados com DETC a 200 μ M por 24 horas, algumas células apresentavam uma marcação com intensidade menor ou ausente em comparação ao controle, indicando que o DETC está bloqueando os tióis da célula (Fig. 7C). Este resultado indica a participação dos tióis livres no efeito giardicida do composto.

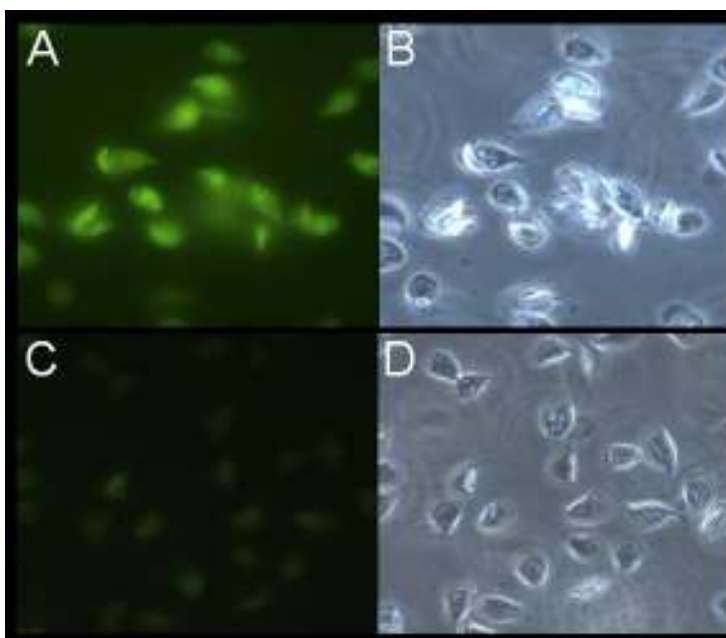


Figura 7. Análise do conteúdo de tióis livres em trofozoítos de *G. lamblia*. Detecção de grupos sulfidrila através da sonda fluorescente *orto*-phthaldialdeído (OPA – A e C). Células controle apresentam uma marcação homogênea, um pouco mais intensa na região anterior de alguns trofozoítos (A). Trofozoítos de *Giardia lamblia* tratados com 200 μ M de DETC por 24 horas, apresentando uma fraca marcação (C) em relação ao controle. Visualização das células por microscopia de contraste de fase (B e D).

5.5. Determinação de tióis totais em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com o objetivo de detectar as concentrações totais de grupos tiol presentes neste parasito, foi utilizado o reagente de Ellman (1959), que determina quantitativamente grupos sulfidril em amostras biológicas. Após 2 horas de incubação com 100 μ M de DETC, foi possível observar um decréscimo do conteúdo de grupamentos tiol totais em comparação ao controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significante (Fig. 8). O metronidazol nas mesmas concentrações não levou à diminuição destes grupos sulfidril, com níveis de detecção comparáveis aos do controle. Quando as células foram incubadas com a associação de ambos, observamos uma diminuição da expressão de grupamentos tiol, porém houve um discreto aumento em comparação ao DETC. Estes resultados sugerem que o DETC diminui a capacidade antioxidante de *G. lamblia* através do decréscimo da expressão de grupos tiol presentes neste parasito, não havendo efeitos aditivos ou sinérgicos entre os compostos.

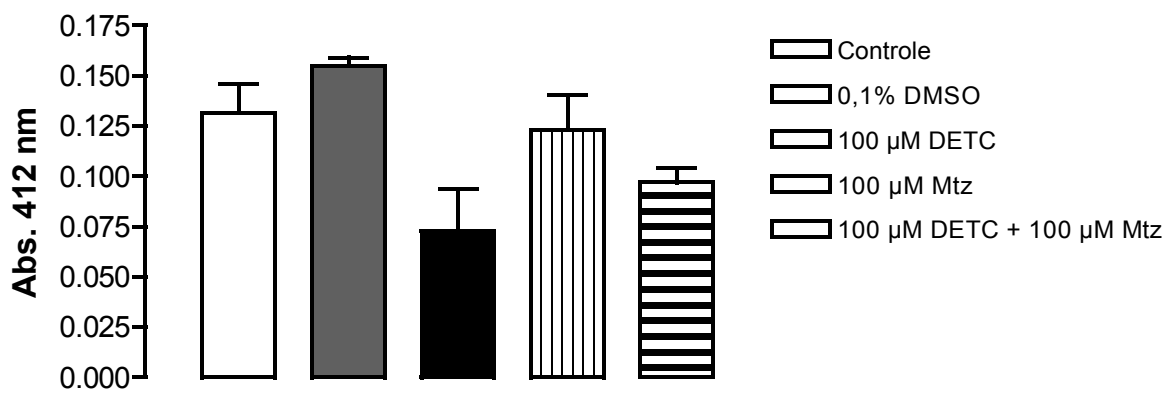


Figura 8. Quantificação dos grupos sulfidril em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Houve uma diminuição dos níveis de tióis totais em células tratadas com 100 μ M de DETC por 2 horas em relação ao controle, porém esta redução não foi estatisticamente significante ($p > 0,05$). Parasitos tratados com metronidazol apresentaram valores semelhantes ao controle e a combinação do DETC com o metronidazol levou a um discreto aumento dos níveis de tióis livres em comparação ao DETC.

5.6. Avaliação da participação dos grupamentos tiol na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Após a determinação dos tióis livres, nós avaliamos a participação destes grupamentos na proliferação de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*. Em células tratadas com 25 μ M de DETC por 24 horas, observamos um decréscimo na proliferação celular em relação às células controle (Fig. 9). A adição de 25 μ M de N-acetilcisteína (NAC) no meio de cultura não afetou a proliferação do parasito *in vitro*. A incubação das células com DETC e NAC, ambos a 25 μ M, levou à reversão parcial do efeito giardicida do DETC, aumentando discretamente à medida que elevamos a concentração do NAC (Fig. 9). Estes dados indicam que o efeito do DETC nestas células está associado, ao menos parcialmente, com os grupamentos tiol presentes neste parasito, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, já que a NAC não foi capaz de reverter totalmente os efeitos causados pelo DETC.

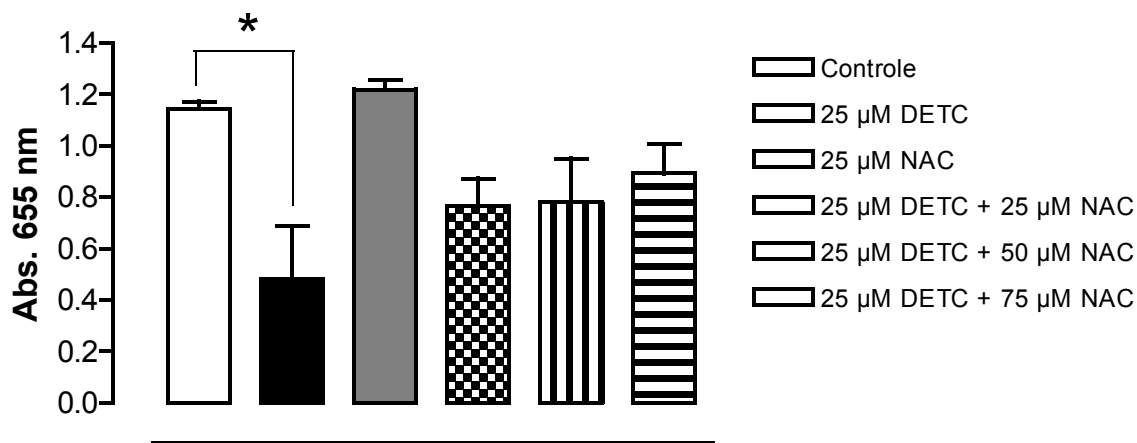
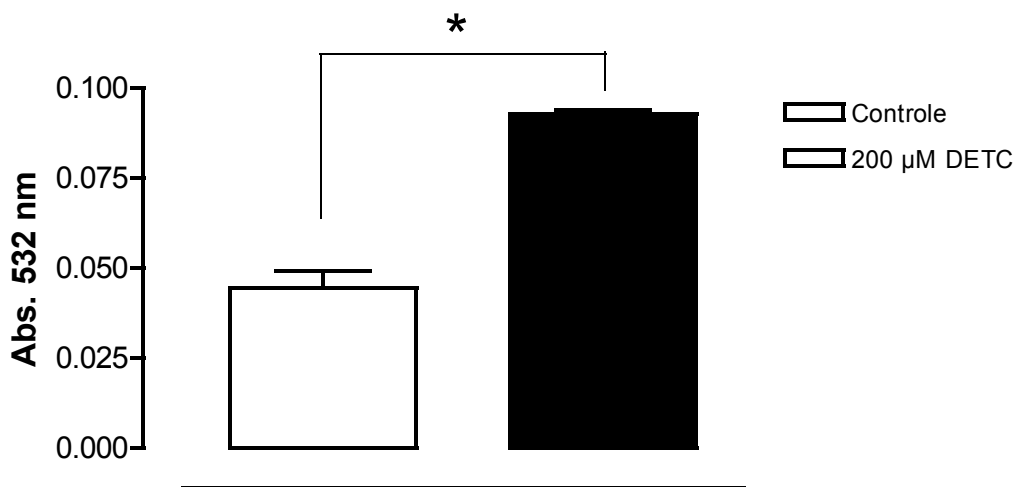


Figura 9. Efeitos do DETC na proliferação de trofozoítos de *Giardia* em presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC). Células tratadas com 25 μ M de DETC apresentaram uma redução na proliferação em comparação ao controle (*, $p < 0,05$). Quando associamos o NAC ao DETC em diferentes proporções há uma reversão parcial do efeito inibitório do DETC.

5.7. Quantificação de lipoperóxidos em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Com a observação de que o DETC é capaz de diminuir os níveis de tíóis livres neste parasito e por conseqüência a sua capacidade antioxidante, decidimos verificar os danos oxidativos celulares através da quantificação bioquímica da peroxidação lipídica através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Em células tratadas com 200 μ M de DETC por 4 horas, houve um aumento significativo desta lipoperoxidação (Fig. 10A). A associação do DETC com a NAC foi capaz de reverter a lipoperoxidação causada pelo DETC (Fig. 10B). Estes dados sugerem que o DETC está elevando o estresse oxidativo, sendo este efeito modulado por cisteína, possivelmente pela interação destas duas moléculas com conseqüente inibição da atividade do DETC.

(A)



(B)

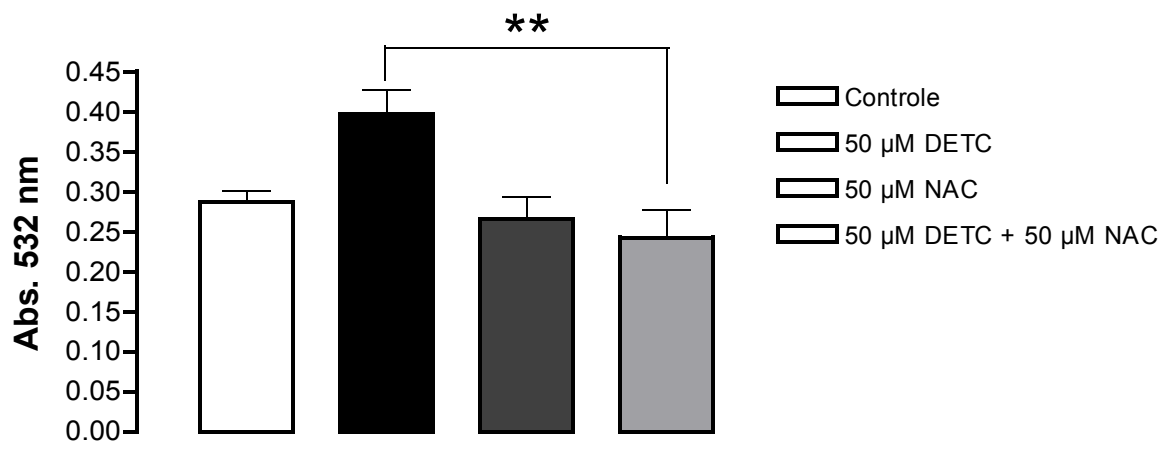


Figura 10. Avaliação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células tratadas com 200 μM de DETC por 4 horas apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica em relação ao controle (*t* de Student, * $p < 0,001$). (B) Houve uma reversão dos efeitos do DETC quando foi realizado o co-tratamento com a NAC, em parasitos tratados por 2 horas (** $p < 0,05$).

5.8. Detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*

Como um dos efeitos do DETC é o aumento dos danos oxidativos celulares em trofozoítos de *Giardia*, resolvemos em seguida avaliar a produção espécies reativas através da sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes), que é permeável à membrana celular, se tornando impermeável no espaço intracelular quando se liga a espécies reativas de oxigênio, emitindo fluorescência. A maioria das células controle estavam viáveis, com grande motilidade ou aderidas à lâmina de vidro, não apresentando marcação para a sonda (Fig. 11A - B). Os trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora se encontravam menos móveis e com alterações morfológicas na superfície celular. Nestas células observou-se uma marcação homogênea (Fig. 11C), um pouco mais pronunciada em regiões de protuberância membranosa, conhecidas como “blebs” (Fig. 11D). Assim como no controle, as células tratadas com 200 µM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação para a sonda. Isto provavelmente se deve ao fato de que a grande maioria destas células já estavam mortas, não sendo possível a detecção da sonda intracelularmente (Fig. 11E - F).

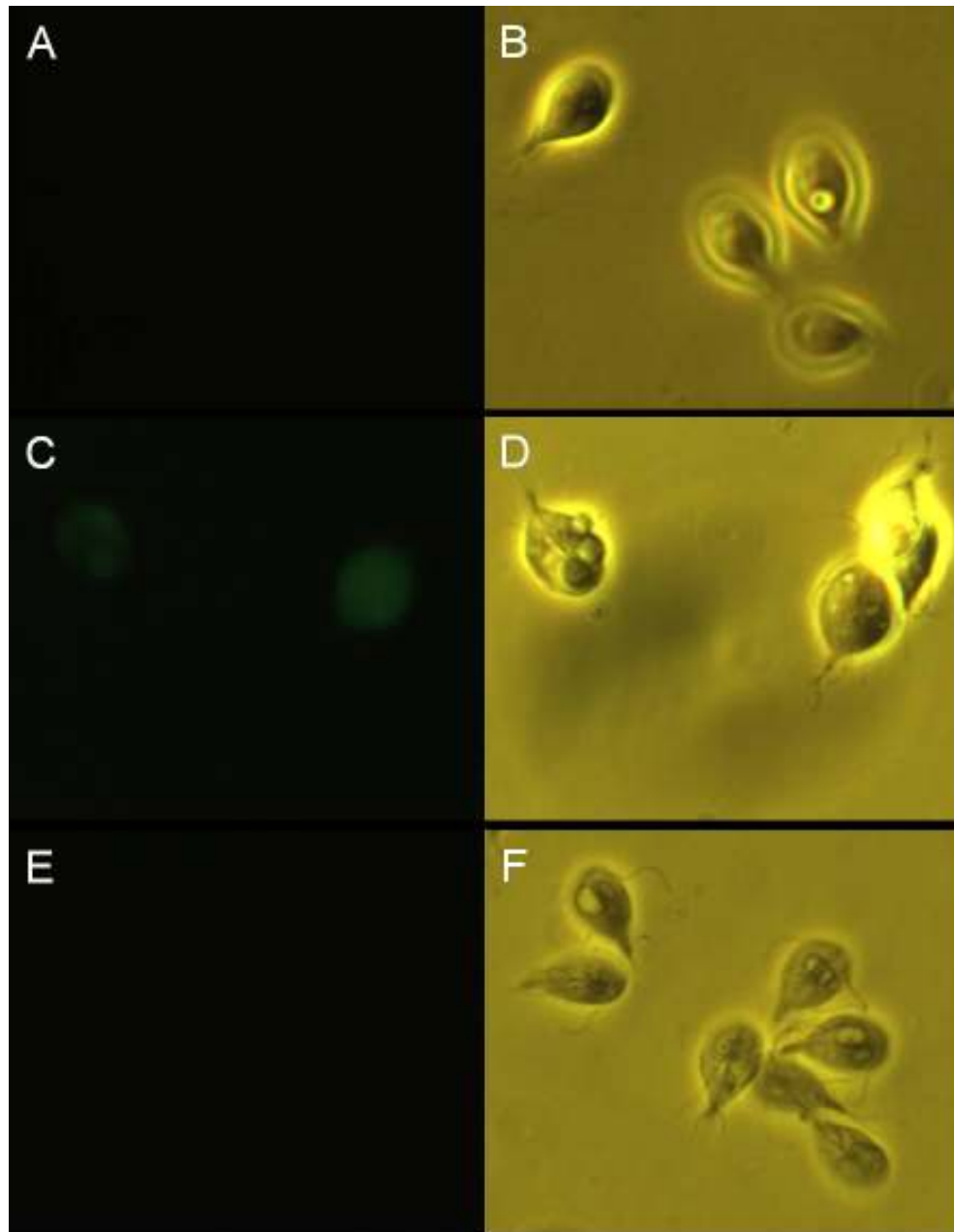


Figura 11. Microscopia de fluorescência (A ,C ,E) e contraste de fase (B, D ,F) para detecção de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia*. A sonda fluorescente 5'- (6')- carboxi 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) foi utilizada para detecção de espécies reativas neste parasito. Células controle não apresentaram marcação. (A e B) O tratamento com 100 μM de DETC por 1 hora levou ao aparecimento de células com alterações morfológicas (D) e marcadas com a sonda fluorescente (C). Trofozoítos tratados com 200 μM de DETC por 1 hora não apresentaram marcação com H₂DCFDA (E), possivelmente porque estas já estavam mortos (F).

5.9. Avaliação ultraestrutural dos efeitos do DETC

Para entender melhor os efeitos do DETC em trofozoítos de *G. lamblia*, nós incubamos as células em presença ou ausência de 200 μM desta substância por 24 horas e depois de processadas, foram visualizadas em MET. As células controle apresentavam-se íntegras com uma grande quantidade de partículas de glicogênio e cisternas de retículo endoplasmático distribuída pelo citoplasma (Fig. 12A). Vesículas periféricas foram observadas subjacentes à membrana plasmática (Fig. 12B). Nestas células também podemos verificar em corte transversal estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos, o funis (Fig. 12C) e o disco adesivo (Fig. 12D). Os núcleos, presentes na região anterior dos parasitos, encontravam-se homogêneos, bem delimitados pela membrana nuclear (Fig. 12D). Em parasitos tratados com DETC, mais de 50% das células apresentavam-se com alto grau de extração citoplasmática, inclusive do conteúdo nuclear (Fig. 13A). Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito (Fig. 13B), sugerido pela presença de estruturas virguliformes ou com dupla membrana circunscrevendo porções citoplasmáticas. Possível participação do retículo endoplasmático é sugerida, já que este se encontrava dilatado e próximo às vesículas (Fig. 13C), que também se apresentaram maiores e menos numerosas do que no controle, sugerindo a ocorrência de confluência das mesmas (Fig. 13D).

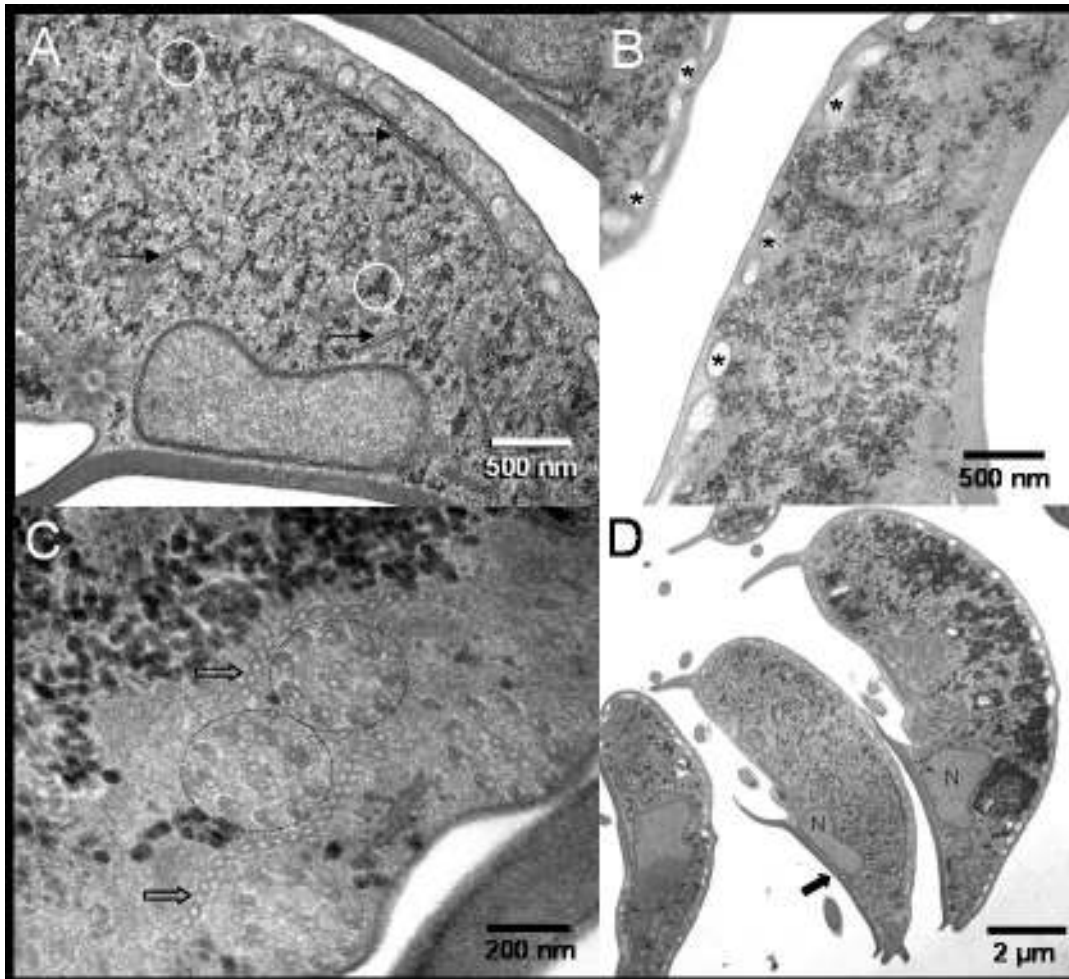


Figura 12. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Células controle apresentando citoplasma homogêneo, com grânulos de glicogênio (assinalado por círculos brancos) e retículo endoplasmático (setas). Em (B), visualizamos as vesículas periféricas (*) na região dorsal da célula. (C) Estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (assinalados por círculos pontilhados) e o corpo funis (setas). Em (D), observamos células em corte longitudinal apresentando núcleos (N) e o disco adesivo (seta).

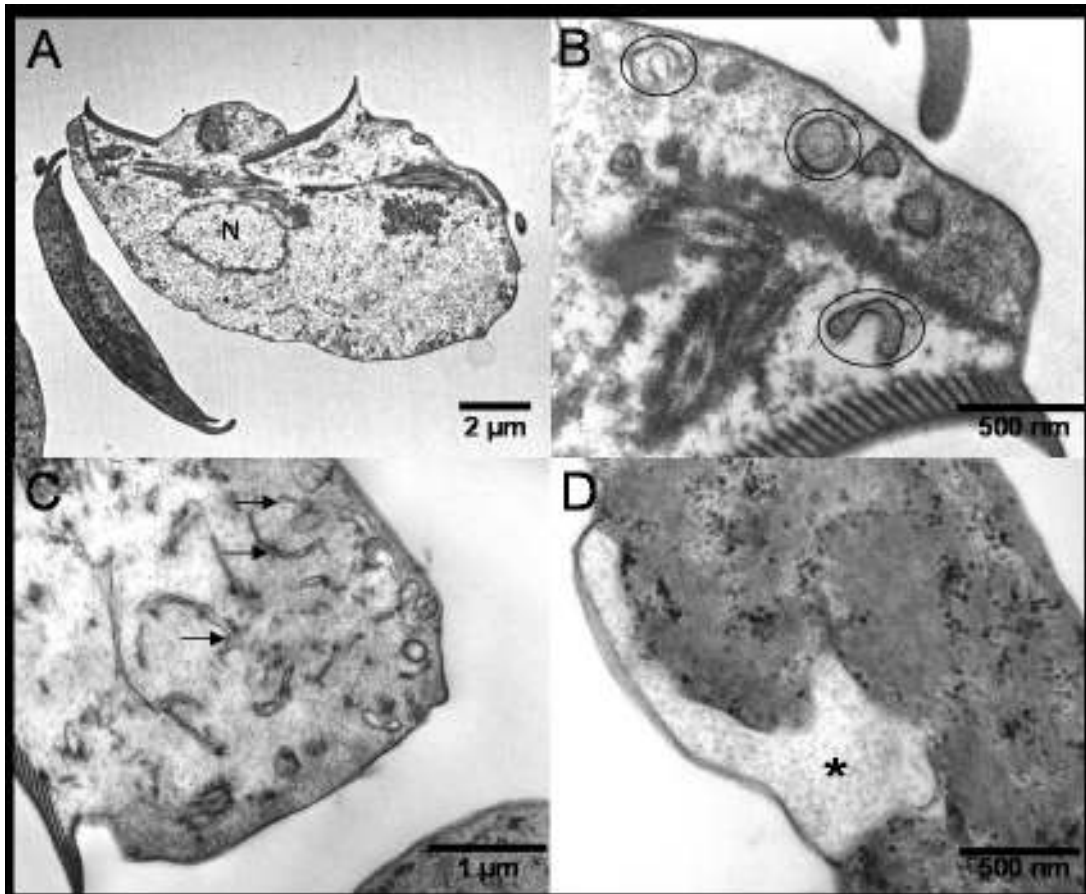


Figura 13. Análise ultraestrutural de trofozoítos de *G. lamblia* tratados com DETC. (A) Células tratadas com 200 μ M de DETC por 24 horas apresentando reduzida eletrondensidade de citoplasma e nucleoplasma, em comparação às células controle (Fig. 12). (B) Visualização de vesículas virguliformes ou com dupla membrana (assinaladas por círculos), sugerindo possíveis processos autofágicos. Em (C), observamos este mesmo processo, com provável participação do retículo endoplasmático, que se encontra mais dilatado quando comparado ao controle. Em (D), visualizamos uma célula apresentando grande compartimento alongado, presumivelmente formado pela fusão homofílica das vesículas periféricas.

6. DISCUSSÃO

A elucidação dos efeitos do DETC, um conhecido inibidor de SOD, é de importância fundamental para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos em sua atividade giardicida, já que a ausência de SOD em *Giardia* nos permite evidenciar a existência de efeitos independentes desta enzima, produzidos pela ação do DETC em protozoários parasitas.

Apesar de ser efetivo contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, a inibição da proliferação celular pelo DETC aparentemente não é dose-dependente. Uma das possíveis explicações para este fato é que esta substância pode ser oxidada de forma muito rápida, principalmente em soluções, perdendo parte da sua atividade. Outra possibilidade é que o composto atue sobre um limitado “pool” de resíduos de cisteína, assim o efeito atingiria um plateau ao reagir com os grupos SH disponíveis. A manipulação deste composto precisa ser feita com presteza, evitando sua exposição ao ar e/ou aumento da temperatura. Embora seja uma droga relativamente instável, seu efeito giardicida é bastante satisfatório, com níveis comparáveis ao do metronidazol *in vitro*.

O dissulfiram, medicamento utilizado no tratamento contra o alcoolismo, age como um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (Brien & Loomis, 1985). Este fármaco sofre rápida redução enzimática no sangue pela glutathione redutase (Strömme, 1963; Cobby *et al.*, 1977), mas pode também ser reduzido de forma não enzimática pela albumina (Agarwal *et al.*, 1983). Subseqüentemente, DETC é metabolizado por tiol metiltransferase ou tiopurina metiltransferase a DETC-Me (Gessner & Jakubowski, 1972; Glauser *et al.*, 1993; Lill *et al.*, 1996), que sofre oxidação principalmente pelo citocromo P-450, com uma contribuição minoritária de flavina monooxigenases (Johansson *et al.*, 1989). Os metabólitos oxidados do dissulfiram têm sido descritos como potentes inibidores da ALDH, através da carbamilação de um grupo tiol crítico no sítio ativo da enzima (Jin *et al.*, 1994; Tonkin *et al.*, 2003).

Por ser reduzido rapidamente *in vivo* a DETC, o dissulfiram se torna uma poderosa ferramenta quimioterápica no tratamento contra a giardiase. Este fármaco já foi testado *in vitro* e *in vivo* contra *Giardia lamblia* (Nash & Rice, 1998), com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo para o DETC com trofozoítos *in vitro*.

Quando analisamos a associação do DETC com o metronidazol, verificamos que não houve um efeito sinérgico entre estas duas drogas. Em *Entamoeba histolytica*, o metronidazol é capaz de se ligar covalentemente a algumas proteínas específicas, incluindo superóxido dismutase e tioredoxina redutase, esta última sendo uma das responsáveis pela ativação do metronidazol neste protozoário através da redução do grupo nitro (Leitsch *et al.*, 2007). Além

disso, os níveis de cisteína são reduzidos com a adição do metronidazol, provavelmente pela reação desta droga com os grupos sulfidríla acessíveis neste parasito (Leitsch *et al.*, 2007). Como a tioredoxina redutase é uma enzima muito comum, é provável que processos similares ocorram em outros organismos procarióticos e/ou eucarióticos. Nesse sentido, o efeito giardicida do DETC e metronidazol pode estar associado à competição de ambas as drogas pelos mesmos mecanismos de ativação em *Giardia lamblia*, que apresenta uma enzima semelhante à tioredoxina redutase, a dissulfeto redutase (Brown *et al.*, 1996b) e proteínas ricas em cisteína (Luján & Nash, 1994). Em *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*, o mecanismo deste 5-nitroimidazol está relacionado à sua redução pela piruvato:ferredoxina oxidorreductase a radicais citotóxicos que levam a danos irreversíveis e morte celular (Müller, 1986). Apesar disso, resistência ao metronidazol em *E. histolytica* pode ser atribuída à diminuição de enzimas antioxidantes, como peroxiredoxina (Wassmann *et al.*, 1999) e superóxido dismutase (Samarawickrema *et al.*, 1997), assim como em *G. lamblia*, onde o aumento da atividade da enzima NADH oxidase tem sido associado a cepas resistentes ao metronidazol (Ellis *et al.*, 1993).

Alguns trabalhos têm desencorajado a utilização do dissulfiram e metronidazol em associação, principalmente pelo acúmulo de acetaldeído causado pela inibição da enzima ALDH por estes fármacos (Gardner & Hill, 2001) em pacientes que fazem ingestão de álcool, levando ao efeito “antabuse” (sensação de calor, náusea, vômitos e taquicardia) (Finegold, 1980; Edwards *et al.*, 1986; Krulewitch, 2003). A utilização destas duas drogas em conjunto poderia potencializar este efeito, além de causar em alguns pacientes reações psicóticas, conforme alertado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu bulário eletrônico.

Quando analisamos a incorporação de timidina por células do baço na presença de diferentes concentrações de DETC ou metronidazol, observamos que não houve uma diferença significativa nos níveis de incorporação entre as células controle e tratadas com o metronidazol. No entanto, o DETC apresentou atividade citotóxica dose-dependente nas concentrações acima de 111 μM . Apesar disso, o valor de IC_{50} encontrado para trofozoítos de *Giardia* (*i.e.* 2 μM) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A farmacocinética e os efeitos colaterais do dissulfiram têm sido extensivamente estudados, gerando dados para a elaboração de formulações e regimes terapêuticos apropriados. Sua biodisponibilidade é maior que 80% após administração oral e a eliminação do dissulfiram e seus metabólitos é um processo lento. Aproximadamente 20% da droga permanece no corpo após 1 a 2 semanas (Ellenhorn *et al.*, 1997 *apud* Sauna *et al.*, 2005). Apesar de ser recomendado o monitoramento de pacientes que usam altas doses do dissulfiram (acima de 250 mg por dia)

(Fuller & Gordis, 2004), existem poucos efeitos colaterais associados com longos períodos de tratamento. Hepatotoxicidade é a causa mais comum de preocupações durante a utilização do dissulfiram (Sauna *et al.*, 2005), contudo este efeito adverso é geralmente reversível quando seu uso é interrompido na presença de manifestações clínicas (Wright *et al.*, 1988). A excelente tolerância e ausência de efeitos colaterais graves tornam o dissulfiram uma droga segura e eficaz, inclusive com aprovação pela FDA e ANVISA.

A redução nos níveis de grupamentos tiol em trofozoítos tratados com DETC foi observada tanto por microscopia de fluorescência, quanto pela avaliação quantitativa através do reagente de Ellman (DTNB). Estes resultados sugerem que o DETC esteja carbamilando e/ou formando pontes dissulfeto com grupamentos tiol livres que estão presentes em *Giardia* e que são responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito, a exemplo das proteínas ricas em cisteína e dissulfeto redutase. De modo interessante, a atividade do dissulfiram em trofozoítos de *G. lamblia* foi reduzida pela adição de cisteína ao meio (Nash & Rice, 1998), sugerindo que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga. O metronidazol também reduziu os níveis de tióis totais em *Giardia*, porém não houve diferenças entre o tratamento com as drogas feito isoladamente ou em conjunto.

Cepas de *Giardia lamblia* resistentes ao metronidazol estão associadas a um aumento da atividade da enzima NADH oxidase, possibilitando a detoxificação de espécies oxidativas (Ellis *et al.*, 1993). É provável que cepas sensíveis ao metronidazol sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, já que estas apresentam diminuição do consumo de O₂ (Ellis *et al.*, 1993), com possível redução dos níveis de grupos sulfidril livres, que podem ser oxidados através da ativação do grupo nitro deste fármaco.

Para confirmar o papel dos grupamentos tiol no efeito giardicida do DETC, nós incubamos os trofozoítos de *Giardia* em concentrações crescentes de NAC, associadas ou não a este composto. Não houve diferenças significativas entre células tratadas com 25 µM de NAC e o grupo controle, porém houve uma diminuição significativa da proliferação celular quando adicionamos 25 µM de DETC ao meio de cultura. A pré-incubação do NAC com o DETC na proporção 1:1 reverteu parcialmente a inibição, aumentando discretamente à medida que esta proporção de NAC foi aumentada. A presença de resíduos de cisteína tem sido enfatizada na literatura como um fator de crescimento essencial para *Giardia lamblia* (Luján & Nash, 1994), conferindo proteção contra os efeitos letais do oxigênio (Fairlamb, 1989). As análises de incorporação de L-cisteína por este parasito indicam a presença de ao menos dois sistemas de transporte. L-cistina não foi incorporada pelos trofozoítos, sugerindo a ausência de um sistema de transporte e a especificidade dos transportadores de cisteína. *Giardia* não é capaz de sintetizar

cisteína ou metionina a partir de sulfato, nem de converter metionina em cisteína, sendo assim o protozoário é auxotrófico para este aminoácido (Luján & Nash, 1994).

As CRPs, também conhecidas como proteínas variantes de superfície (VSPs), são os principais antígenos de *Giardia lamblia*. Cerca de 150 diferentes genes que codificam estas proteínas tem sido identificados no genoma deste parasito. Somente uma VSP é expressa por trofozoíto, permitindo que *Giardia* mude a expressão desta proteína em sua superfície (Nash, 2002). O mecanismo desta variação antigênica ainda não está claro, mas este não envolve rearranjo de DNA e é refletido por mudanças na expressão gênica em nível de RNA mensageiro (Nash, 2002). Diferenciação pode induzir variação antigênica *in vitro* (Svård *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002;) e *in vivo* (von Allmen *et al.*, 2004). Análises de anticorpos IgA anti-*Giardia* em leite materno de mães que vivem em área endêmica de giardiase, provavelmente com múltiplas infecções com diferentes cepas de *Giardia*, revelou que as VSPs são as proteínas imunorreativas dominantes (Téllez *et al.*, 2005).

Estes dados nos indicam que a reação com grupos tiol é um importante mecanismo de ação desta droga, apesar de não ser o único. Em 1930, o dissulfiram começou a ser utilizado como escabicida e vermífico por ser um quelante de cobre, um componente essencial da cadeia respiratória de artrópodes e helmintos (Eneanya *et al.*, 1981). A atividade quelante de metal também é relatada para o DETC, que é um específico inibidor de Cu-Zn superóxido dismutase (Pritsos *et al.*, 1989; Majid & Nishiyama, 2002). As proteínas com motivos dedo de zinco são essenciais para o funcionamento celular normal (Berg & Shi, 1996), tornando-se um importante alvo terapêutico (Rein *et al.*, 1997). *Giardia* expressa altos níveis de CRP na superfície, as quais possuem motivos dedo de zinco (Luján *et al.*, 1995c). O zinco pode ser quelado pelo DETC, se apresentando como uma outra via de atuação desta droga neste parasito.

Os danos oxidativos celulares em membranas de trofozoítos tratados com DETC foram avaliados através da formação de um produto citotóxico, o malondialdeído (MDA), que se liga ao TBA gerando uma reação colorimétrica indicativa da peroxidação lipídica (Bellé *et al.*, 2004). Houve um aumento significativo da lipoperoxidação em parasitos tratados com 200 µM DETC, por 4 horas. O metronidazol levou a um aumento discreto da peroxidação lipídica e a associação entre o DETC e o metronidazol não elevou significativamente a peroxidação, com níveis comparáveis ao DETC utilizado isoladamente, provavelmente porque a concentração do DETC já estava alta, levando ao plateau da peroxidação celular. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, no entanto as membranas são um dos componentes mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação (Ferreira & Matsubara, 1997). Este processo pode levar à morte celular através de alterações na estrutura e permeabilidade de

membrana, levando à perda de seletividade na troca iônica e liberação de conteúdo das organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas (Hershko, 1989). O NAC foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do DETC, demonstrando a importância dos grupamentos tiol no mecanismo de ação desta droga.

Baseado na confirmação de que o DETC promove lipoperoxidação, provavelmente pelo aumento da geração de radicais livres de oxigênio, resolvemos avaliar a produção de espécies reativas por esta droga em *Giardia lamblia* com a sonda fluorescente H₂DCFDA. As células controle não apresentaram marcação para a sonda, enquanto que trofozoítos tratados com 100 µM de DETC por 1 hora foram marcados de forma homogênea, demonstrando que este tiocomposto está aumentando a formação de espécies reativas em trofozoítos de *Giardia lamblia*. Isto se deve ao fato de que a redução de grupos sulfidril livres pode estar afetando o potencial redutor deste parasito, levando ao aumento do estresse oxidativo. O mesmo não pôde ser visualizado em células tratadas com 200 µM de DETC, possivelmente porque estas já se encontravam mortas.

Os metabólitos mais comuns produzidos pela utilização do oxigênio em organismos aeróbicos são o radical superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que participa da reação que produz o radical hidroxila (OH[•]), sendo este último extremamente reativo (Cadenas, 1989). Superóxido é usualmente detoxificado pela SOD a peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água por catalase, peroxidase e a enzima dependente de glutatona, glutatona peroxidase (Cadenas, 1989; Fridovich, 1989). Além destas enzimas de detoxificação convencionais, mecanismos alternativos podem ser utilizados para diminuição do estresse oxidativo celular, que incluem as dioxigenases e monooxigenases (citocromo P-450 redutase) (Malmström, 1982). Algumas oxidases dependentes de flavina (NADH oxidase) reduzem tetravalentemente o oxigênio a água, abolindo a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio em bactérias anaeróbicas (Schmidt *et al.*, 1986), assim como a NADH peroxidase, uma flavoenzima envolvida na redução do peróxido que também desempenha papel antioxidante em algumas células (Stanton & Jensen, 1993).

Alguns protozoários microaerófilos também possuem NADH oxidase. *Entamoeba histolytica* contém uma NADPH oxidase dependente de flavina que produz peróxido quando purificada (Lo & Reeves, 1980). *Trichomonas vaginalis* contém uma flavo-oxidase que produz água, além de uma NADPH oxidase produtora de peróxido (Linstead & Bradley, 1988). *Giardia* também apresenta atividades oxidase e peroxidase dependentes de NADH (Brown *et al.*, 1996a; Brown *et al.*, 1998), responsáveis pela capacidade deste parasito de detoxificar o oxigênio. As principais enzimas de detoxificação de espécies oxidantes, como a SOD, catalase, glutatona redutase e glutatona peroxidase não estão presentes neste protozoário, salientando a importância

da manutenção de um ambiente intracelular redutor através da ciclagem redox pelos grupos sulfidrila presentes em *Giardia*.

A elucidação dos efeitos microbicidas do DETC foi possibilitada pela microscopia eletrônica de transmissão, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 200 μM de DETC por 24 horas, houve um alto grau de extração citoplasmática, apresentada por mais de 50% das células. Este efeito é causado provavelmente pelo colapso do potencial de membrana, com conseqüente rompimento da membrana plasmática pelo aumento do estresse oxidativo (Lloyd *et al.*, 2000), onde a indução de radicais livres de oxigênio leva a uma inativação de sistemas que consomem oxigênio, acúmulo de peróxido de hidrogênio e oxidação de grupos tiol.

Prováveis processos autofágicos também foram verificados neste parasito, sugeridos pela presença de estruturas virguliformes ou com membrana dupla, que são semelhantes à formação dos vacúolos em organismos eucariotos (Suzuki & Ohsumi, 2007; Xie & Klionsky, 2007).

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento de sua homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Os mecanismos envolvem a formação de uma estrutura de dupla membrana dentro da célula, chamada de vacúolo autofágico ou autofagossomo, a partir do retículo endoplasmático e vias secretórias iniciais. A fusão com o lisossomo gera o autofagolisossomo, onde as enzimas hidrolíticas agem na degradação do conteúdo interno (Shintani & Klionsky, 2004). Resposta a condições de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismos de autofagia. É possível que *Giardia* também utilize destes mecanismos para evitar a perda da homeostasia com o aumento do estresse oxidativo, como ocorre em outros tipos celulares (Hill *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

A observação de vesículas que se encontravam maiores e menos numerosas em comparação ao controle nos leva a crer que ocorreu a fusão homofílica destes compartimentos. Este processo pode ter sido mediado por pontes dissulfeto que se formam pela ação do DETC entre as cisteínas das proteínas celulares, conferindo uma modificação da conformação tridimensional à molécula, expondo sítios de reconhecimento e/ou catalíticos e ocasionando uma série de alterações na morfologia e funcionamento normais da célula.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem do estresse oxidativo e conteúdo de grupos tiol podem prover valiosas estratégias terapêuticas para a giardiase.

7. CONCLUSÕES

7.1. O DETC mostrou-se efetivo na inibição da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro*, porém este efeito aparentemente não é dose-dependente;

7.2. A associação do DETC com o metronidazol não levou a um efeito sinérgico *in vitro*;

7.3. O DETC promove a redução dos níveis de grupos sulfidril livres, provavelmente pela formação de pontes dissulfeto e/ou carbamilações em moléculas ricas em cisteína que estejam com estes grupamentos tiol acessíveis, como as CRPs, uma das responsáveis pelos mecanismos antioxidantes deste parasito;

7.4. O aumento do estresse oxidativo em trofozoítos de *G. lamblia* pode ser devido à diminuição da capacidade antioxidante deste protozoário, inviabilizando a sua sobrevivência;

7.5. Os resultados apresentados neste trabalho apontam para uma nova abordagem na terapia contra a giardíase. Estudos para avaliação dos efeitos do DETC *in vivo* se colocam como perspectivas em nosso trabalho.

8. REFERÊNCIAS

- ADAGU, I.S., NOLDER, D., WARHURST, D.C., ROSSIGNOL, J.F. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **J Antimicrob Chemother**, 49:103-11, 2002.
- ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev**, 14: 447-75, 2001.
- AGARWAL, R.P., MCPHERSON, R.A., PHILLIPS, M. Rapid degradation of disulfiram by serum albumin. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 42: 293-310, 1983.
- AL-MEKHLAFI, M.S., AZLIN, M., NOR AINI, U., SHAIK, A., SA'IAH, A., FATMAH, M.S., ISMAIL, M.G., AHMAD FIRDAUS, M.S., AISAH, M.Y., ROZLIDA, A.R., NORHAYATI, M. Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in Orang Asli children in Malaysia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 99: 686-91, 2005.
- APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C., OLSON, M.E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. **Trends Parasitol**, 21: 370-6, 2005.
- BASSILY, S., FARID, Z., EL-MASRY, N.A., MIKHAIL, E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J Trop Med Hyg**, 90: 9-12, 1987.
- BELLÉ, N.A., DALMOLIN, G.D., FONINI, G., RUBIN, M.A., ROCHA, J.B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 22: 245-51, 2004.
- BENCHIMOL, M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett**, 1:81-7, 2004.
- BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, 511: 133-44, 2002.
- BERG, J.M., SHI, Y.. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. **Science**, 23: 1081-5, 1996.
- BERNANDER, R., PALM, J.E., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol**, 3: 55-62, 2001.
- BIAGINI, G.A., PARK, J.H., LLOYD, D., EDWARDS, M.R. The antioxidant potential of pyruvate in the amitochondriate diplomonads *Giardia intestinalis* and *Hexamita inflata*. **Microbiology**, 147: 3359-65, 2001.
- BOREHAM, P.F.L. Giardiasis and its control. **Pharm. J**, 234: 271-4, 1991.
- BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J.P. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J Antimicrob Chemother**, 42: 817-20, 1998.

BRAR, S.S., GRIGG, C., WILSON, K.S., HOLDER, W.D., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A.J., WHORTON, A.R., STOWELL, G.W., WHITTALL, L.B., WHITTLE, R.R., WHITE, D.P., KENNEDY, T.P.. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. **Mol Cancer Ther.** 3: 1049-60, 2004.

BREWER, C. How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. **Br J Psychiatry**, 144: 200-2, 1984.

BRIEN, J.F., TAM, G.S., CAMERON, R.J., STEENAART, N.A., LOOMIS, C.W. A comparative study of the inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenases in the rat by methyltetrahydroliothiazol, calcium carbimide, and disulfiram. **Can J Physiol Pharmacol**, 63: 438-43, 1985.

BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., EDWARDS, M.R., UPCROFT, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Eur J Biochem**, 1:155-61, 1996a.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 20: 211-20, 1996b.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Free radical detoxification in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 72: 47-56, 1995.

BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 61: 155-8, 1993.

BURET, A.G., MITCHELL, K., MUENCH, D.G., SCOTT, K.G. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. **Parasitology**, 125: 11-9, 2002.

BUSATTI, H.G., GOMES, M.A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, 101: 819-21, 2007.

CACOPARDO, B., PATAMIA, I., BONACCORSO, V., DI PAOLA, O., BONFORTE, S., BRANCATI, G. Synergic effect of albendazole plus metronidazole association in the treatment of metronidazole-resistant giardiasis **Clin Ter**, 146: 761-7, 1995.

CADENAS, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. **J Biolumin Chemilumin**, 4: 208-18, 1989.

CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Frequência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no município de Aracajú, SE, Brasil. **Rev. Bras. Soc. Med. Trop**, 28: 25-31, 1995.

CARRANZA, P.G., FELTES, G., ROPOLO, A., QUINTANA, S.M., TOUZ, M.C., LUJÁN, H.D. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. **Infect Immun**, 70: 5265-8, 2002.

CHICK, J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. **Drug Saf**, 20: 427-35, 1999.

CHIEN, C.T., SHYUE, S.K., LAI, M.K. Bcl-xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy. **Transplantation**, 15: 1183-90, 2007.

CIMERMAN, B., CURY, F.M., MORENO, C.T. Avaliação terapêutica do secnidazol dose única no tratamento da giardíase em crianças. **Pediatr. Mod**, 6: 1008-1012, 1994.

COBBY, J., MAYERSOHN, M., SELLIAH, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. **J Pharmacol Exp Ther**, 202: 724-31, 1977.

CRUZ, C.C., FERRARI, L., SOGAYAR, R. A therapeutic trial in *Giardia muris* infection in the mouse with metronidazole, tinidazole, secnidazole and furazolidone **Rev Soc Bras Med Trop**, 30: 223-8, 1997.

DA COSTA-MACEDO, L.M., MACHADO-SILVA, J.R., RODRIGUES-SILVA, R., OLIVEIRA, L.M., VIANNA, M.S. Intestinal parasitoses in preschool children of the slum communities of the city of Rio de Janeiro, Brazil **Cad Saude Publica**, 14: 851-5, 1998.

DARBON, A., PORTAL, A., GIRIER, L., PANTIN, J., LECLAIRE, C. Treatment of giardiasis (lamblia) with metronidazole. Apropos of 100 cases. **Presse Med**, 6: 15-6, 1962.

DEHARO, E., BARKAN, D., KRUGLIAK, M., GOLENSER, J., GINSBURG, H. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. **Biochem Pharmacol**, 1: 809-17, 2003.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, 45: 2471-6, 1986.

DUREL, P., ROIRON, V., SIBOULET, A., BOREL, L.J. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. **Br J Vener Dis**, 36: 21-6, 1960.

ECKMANN, L., LAURENT, F., LANGFORD, T.D., HETSKO, M.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F., GILLIN, F.D. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **J Immunol**, 1: 1478-87, 2000.

EDWARDS, D.L., FINK, P.C., VAN DYKE, P.O. Disulfiram-like reaction associated with intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole and metronidazole. **Clin Pharm**, 5: 999-1000, 1986.

ELLIS, J.E., WINGFIELD, J.M., COLE, D., BOREHAM, P.F., LLOYD, D. Oxygen affinities of metronidazole-resistant and -sensitive stocks of *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 23: 35-9, 1993.

- EMMERLICH, V., SCHOLZE, H., GILLIN, F.D., BAKKER-GRUNWALD, T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 87: 112-5, 2001.
- EMMERLICH, V., SANTARIUS, U., BAKKER-GRUNWALD, T., SCHOLZE, H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 131-4, 1999.
- ENEANYA, D.I., BIANCHINE, J.R., DURAN, D.O., ANDRESEN, B.D. The actions of metabolic fate of disulfiram. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 21: 575-96, 1981.
- ERTAN, P., YERELI, K., KURT, O., BALCIOĞLU, I.C., ONAĞ, A. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. **Pediatr Int**, 44: 286-8, 2002.
- ESCOBEDO, A.A., CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother**, 8: 1885-902, 2007.
- FAIRLAMB, A.H. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. **Parasitology**, Suppl: 93-112, 1989.
- FARTHING MJ. Giardiasis. **Gastroenterol Clin North Am**, 25: 493-515, 1996.
- FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev**, 13: 35-54, 2000.
- FEELY, D.E., GARDNER, M.D., HARDIN, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. **J Parasitol**, 77: 441-8, 1991.
- FEELY, D.E., DYER, J.K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. **J Protozool**, 34: 80-3, 1987.
- FEITOSA, G., BANDEIRA, A.C., SAMPAIO, D.P., BADARO, R., BRITES, C. High prevalence of giardiasis and strongyloidiasis among HIV-infected patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect. Dis**, 5: 339-44, 2001.
- FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress **Rev Assoc Med Bras**, 43: 61-8, 1997.
- FINEGOLD, S.M. Metronidazole. **Ann Intern Med**, 93: 585-7, 1980.
- FERNANDES, P.D., ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz J Med Biol Res**, 30: 93-9, 1997.
- FREEMAN, C.D.; KLUTMAN, N.E.; LAMP, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. **Drugs**, 54: 679-708, 1997.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J Biol Chem**, 15: 7761-4, 1989.

- FULLER, R.K., GORDIS, E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? **Addiction**, 99: 21-4, 2004.
- GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, 14: 114-28, 2001.
- GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J., WEINSHILBOUM, R.M. Diethyldithiocarbamate S-methylation: evidence for catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J Pharmacol Exp Ther**, 266: 23-32, 1993.
- GASCÓN, J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea. **Digestion**, 73: 102-8, 2006.
- GESSNER, T., JAKUBOWSKI, M. Diethyldithiocarbamic acid methyl ester. A metabolite of disulfiram. **Biochem Pharmacol**, 15: 219-30, 1972.
- GILLIN, F.D., REINER, D.S., MCCAFFERY, J.M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol**, 50:679-705, 1996.
- GILLIN, F.D., REINER, D.S., BOUCHER, S.E. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia in vitro*. **Infect Immun**, 56: 705-7, 1988.
- GILLIS, J.C., WISEMAN, L.R. Secnidazole. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. **Drugs**, 51: 621-38, 1996.
- GIULIVI, C., TURRENS, J.F., BOVERIS, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 30: 243-51, 1988.
- GU, F., CRUMP, C.M., THOMAS, G. Trans-Golgi network sorting. **Cell Mol Life Sci**, 58: 1067-84, 2001.
- GUERRANT, R.L., KIRCHHOFF, L.V., SHIELDS, D.S., NATIONS, M.K., LESLIE, J., DE SOUSA, M.A., ARAUJO, J.G., CORREIA, L.L., SAUER, K.T., MCCLELLAND, K.E. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J Infect Dis**, 148: 986-97, 1983.
- GUIMARÃES, S., SOGAYAR, M.I.T.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day care centers from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop**, 37: 501-06, 1995.
- GUZIK, T.J., OLSZANECKI, R., SADOWSKI, J., KAPELAK, B., RUDZIŃSKI, P., JOPEK, A., KAWCZYNSKA, A., RYSZAWA, N., LOSTER, J., JAWIEN, J., CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M., CHANNON, K.M., KORBUT, R. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. **J Physiol Pharmacol**, 56: 313-23, 2005.
- HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*-current level of knowledge and outlook. **Parasitol. Res**, 88: 591, 2002.
- HARRIS, J.C., PLUMMER, S., LLOYD, D. Antigiardial drugs. **Appl Microbiol Biotechnol**, 57: 614-9, 2001.

- HALL, A.; NAHAR, Q. Albendazole as a treatment for infectious with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 87: 84-6, 1993.
- HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.
- HILL, B.G., HABERZETTL, P., AHMED, Y., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth muscle cell. **Biochem J**, 3, 2007.
- HILL, D.R. Giardiasis: Issues in diagnosis and management. **Infect. Dis. Clin. N. A**, 7: 503-25, 1993.
- HILL GASTON, J.S., LILICRAP, M.S. Arthritis associated with enteric infection. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, 17: 219-39, 2003.
- HU, P., JIN, L., BAILLIE, T.A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary N-acetylcysteine conjugates. **J Pharmacol Exp Ther**, 281: 611-7, 1997.
- ISAAC-RENTON, J., MOOREHEAD, W., ROSS, A. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies: cyst levels, parasite viability, and health impact. **Appl. Environ. Microbiol**, 62: 47-54, 1996.
- ISAAC-RENTON, J.L., CORDEIRO, C., SARAFIS, K., SHAHRIARI, H. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. **J Infect Dis**, 167: 431-40, 1993.
- JARROLL, E.L., SENER, K. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. **Drug Resist Updat**, 6: 239-46, 2003.
- JIN, L., DAVIS, M.R., HU, P., BAILLIE, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethylthiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. **Chem Res Toxicol**, 7: 526-33, 1994.
- JOHANSSON, B., PETERSEN, E.N., ARNOLD, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester. A potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethylthiocarbamic acid methyl ester. **Biochem Pharmacol**, 38: 1053-9, 1989.
- JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*, 83: 399-404, 1982.
- JOKIPII, L., JOKIPII, A.M. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. **J Infect Dis**, 140: 984-8, 1979.
- KATIYAR, S.K., GORDON, V.R., MCLAUGHLIN, G.L., EDLIND, T.D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrob Agents Chemother**, 38: 2086-90, 1994.

- KATTENBACH, W.M., PIMENTA, P.F., DE SOUZA, W., PINTO DA SILVA, P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res**, 77: 651-8, 1991.
- KAVOUSHI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, 28: 19-23, 1979.
- KEISTER, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 77: 487-88, 1983.
- Krulewitch, C.J. An unexpected adverse drug effect. **J Midwifery Womens Health**, 48: 67-8, 2003.
- KUŹMICKI, R., JESKE, J. Observations of the efficacy of ornidazole (Tiberall La Roche) in treatment of giardiasis. **Wiad Parazytol**, 40: 65-8, 1994.
- LANFREDI-RANGEL, A., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**, 85: 951-5, 1999.
- LANFREDI-RANGEL, A., KATTENBACH, W.M., DINIZ, J.A. JR., DE SOUZA, W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett**, 15: 245-51, 1999.
- LANFREDI-RANGEL, A., ATTÍAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH, W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol**, 123: 225-35, 1998.
- LEITSCH, D., KOLARICH, D., WILSON, I.B., ALTMANN, F., DUCHÊNE, M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol**, 5: 211, 2007.
- LEMÉE, V., ZAHARIA, I., NEVEZ, G., RABODONIRINA, M., BRASSEUR, P., BALLEST, J.J., FAVENNEC, L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **J Antimicrob Chemother**, 46: 819-21, 2000.
- LEVI, G.C., DE AVILA, C.A., NETO, V.A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 19: 422-4, 1977.
- LI, L., WANG, C.C. A likely molecular basis of the susceptibility of *Giardia lamblia* towards oxygen. **Mol Microbiol**, 59: 202-11, 2006.
- LILL, R., KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, 25: 352-6, 2000.
- LILL, J.S., MAYES, D.C., LIPSKY, J.J. S-methylation of diethyldithiocarbamic acid in rat liver microsomes. **Xenobiotica**, 26: 1025-33, 1996.
- LINDMARK, D.G. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. **Exp Parasitol**, 65: 141-7, 1988.

- LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, 10: 476-82, 1976.
- LINSTEAD, D.J., BRADLEY, S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15: 125-33, 1988.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., MITCHELL, A., HUGHES, M.N., WADLEY, R.B., EDWARDS, M.R. Nitrosative stress induced cytotoxicity in *Giardia intestinalis*. **J Appl Microbiol**, 5: 576-83, 2003.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., WADLEY, R., RALPHS, J.R., HANN, A.C., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The "primitive" microaerophile *Giardia intestinalis* (syn. *lamblia*, *duodenalis*) has specialized membranes with electron transport and membrane-potential-generating functions. **Microbiology**, 148: 1349-54, 2002.
- LLOYD, D., HARRIS, J.C., MAROULIS, S., BIAGINI, G.A., WADLEY, R.B., TURNER, M.P., EDWARDS, M.R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, 146 12: 3109-18, 2000.
- LO, H., REEVES, R.E. Purification and properties of NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, 2: 23-30, 1980.
- LOEWENSON, R., MASON, P.R., PATTERSON, B.A. Giardiasis and the nutritional status of Zimbabwean schoolchildren. **Ann Trop Paediatr**, 6: 73-8, 1986.
- LOO, T.W., CLARKE, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. **J Natl Cancer Inst**, 7: 898-902, 2000.
- LÓPEZ NIGRO, M.M., PALERMO, A.M., MUDRY, M.D., CARBALLO, M.A. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. **Toxicol In Vitro**, 17: 35-40, 2003.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., NASH, T.E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, 61: 294-304, 1997.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., BYRD, L.G., NASH, T.E. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 23: 7628-33, 1996.
- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem**, 8: 29307-13, 1995a.
- LUJÁN, H.D., MAROTTA, A., MOWATT, M.R., SCIACKY, N., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., NASH, T.E. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**, 3: 4612-8, 1995b.

- LUJÁN, H.D., MOWATT, M.R., WU, J.J., LU, Y., LEES, A., CHANCE, M.R., NASH, T.E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. **J Biol Chem**, 9: 13807-13, 1995c.
- LUJÁN, H.D., NASH, T.E. The uptake and metabolism of cysteine by *Giardia lamblia* trophozoites. **J Eukaryot Microbiol**, 41: 169-75, 1994.
- MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. Strongyloides stercoralis and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93: 161-4, 1998.
- MACHADO, R.C., MARCARI, E.L., DE FÁTIMA, S., CRISTANTE, V., CARARETO, C.M.A. Giardíase e helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). **Rev. Brás. Méd. Trop**, 32: 697-704, 1999.
- MADAN, A., PARKINSON, A., FAIMAN, M.D. Identification of the human and rat P450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl N,N-diethylthiolcarbamate (DETC-ME). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. **Drug Metab Dispos**, 23:1153-62, 1995.
- MAJID, D.S., NISHIYAMA, A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. **Hypertension**, 39: 293-7, 2002.
- MALMSTRÖM, B.G. Enzymology of oxygen. **Annu Rev Biochem**, 51: 21-59, 1982.
- MEHLOTRA, R.K., TEKWANI, B.L. Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Microbes Infect**, 1: 385-94, 1999.
- MORGAN, U.M., REYNOLDSON, J.A., THOMPSON, R.C. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 328-31, 1993.
- MÜLLER, N., VON ALLMEN, N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. **Int J Parasitol**, 35: 1339-47, 2005.
- MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem Pharmacol**, 1; 35: 37-41, 1986.
- MÜLLER, M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. **Surgery**, 93: 165-71, 1983.
- MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I., QUEIROZ, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, 35: 133-41, 2002.
- NASH, T.E. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 45: 585-90, 2002.
- NASH, T., RICE, W.G. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1488-92, 1998.

NEWMAN, R.D., MOORE, S.R., LIMA, A.A., NATARO, J.P., GUERRANT, R.L., SEARS, C.L. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. **Trop Med Int Health**, 6: 624-34, 2001.

OBERHUBER, G., VOGELSANG, H., STOLTE, M., MUTHENTHALER, S., KUMMER, A.J., RADASZKIEWICZ, T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. **Am J Pathol**, 148: 1351-7, 1996.

OLNESS, K. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. **J Dev Behav Pediatr**, 24: 120-30, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Foodborne Diseases**, 2002. <disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em out, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The World Health Report**, Geneva, 1996

ORLANDI, P.P., SILVA, T., MAGALHÃES, G.F., ALVES, F., DE ALMEIDA CUNHA, R.P., DURLACHER, R., DA SILVA, L.H. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 621-5, 2001.

ORTEGA, Y.R., ADAM, R.D. *Giardia*: overview and update. **Clin Infect Dis**, 25: 545-9, 1997.

PAGET, T.A., RAYNOR, M.H., SHIPP, D.W., LLOYD, D. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. **Mol Biochem Parasitol**, 42: 63-7,

PAGET, T.A., JARROLL, E.L., MANNING, P., LINDMARK, D.G., LLOYD, D. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. **J Gen Microbiol**, 135: 145-54, 1989.

PILON-SMITS, E.A., GARIFULLINA, G.F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K.L., BURKHEAD, J.L., ESAKI, N., KURIHARA, T., PILON, M. Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. **Plant Physiol**, 130: 1309-18, 2002.

PIMENTEL, D., COOPERSTEIN, S., RANDELL, H., FILIBERTO, D., SORRENTINO, S., KAYE, B., NICKLIN, C., YAGI, J., BRIAN, J., O'HERN, J., HABAS A., WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, 35: 653-668, 2007.

PRITSOS, C.A., KEYES, S.R., SARTORELLI, A.C. Effect of the superoxide dismutase inhibitor, diethyldithiocarbamate, on the cytotoxicity of mitomycin antibiotics. **Cancer Biochem Biophys**, 10: 289-98, 1989.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, 90: 19-39, 2003.

RAIPULIS, J., TOMA, M.M., SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **Int J Food Microbiol**, 25: 343-7, 2005.

- REIN, A., OTT, D.E., MIRRO, J., ARTHUR, L.O., RICE, W.G., HENDERSON, L.E. Suppression of retroviral replication: inactivation of murine leukemia virus by compounds reacting with the zinc finger in the viral nucleocapsid protein. **Leukemia**, 11: 106-8, 1997.
- REINER, D.S., MCCAFFERY, M., GILLIN, F.D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol**, 53: 142-53, 1990.
- RIVAS, L., MURZA, A., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., GARCÍA-RAMOS, J.V. Interaction of anti-malarial drug quinacrine with nucleic acids of variable sequence studied by spectroscopic methods. **J Biomol Struct Dyn**, 18: 371-83, 2000.
- ROE, F.J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surgery**, 93: 158-64, 1983.
- SAMARAWICKREMA, N.A., BROWN, D.M., UPCROFT, J.A., THAMMAPALERD, N., UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **J Antimicrob Chemother**, 40: 833-40, 1997.
- SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, 43: 1533-41, 1999.
- SAUNA, Z.E., SHUKLA, S., AMBUDKAR, S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Mol Biosyst**, 1: 127-34, 2005.
- SAUNA, Z.E., NANDIGAMA, K., AMBUDKAR, S.V. Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. **J Biol Chem**, 19: 48855-64, 2004.
- SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, 22: 203-8, 2006.
- SCHERZ-SHOVAL, R., SHVETS, E., FASS, E., SHORER, H., GIL, L., ELAZAR, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. **EMBO J**, 4: 1749-60, 2007.
- SCHMIDT, H.L., STÖCKLEIN, W., DANZER, J., KIRCH, P., LIMBACH, B. Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. **Eur J Biochem**, 1: 149-55, 1986.
- SCULLY, B.E. Metronidazole. **Méd. Clin. North Am**, 72: 613-21, 1988.
- SHINTANI, T., KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science**, 5: 990-5, 2004.
- SLAVIN, I., SAURA, A., CARRANZA, P.G., TOUZ, M.C., NORES, M.J., LUJÁN, H.D. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol**, 122: 95-8, 2002.

- SMITH, N.C., BRYANT, C., BOREHAM, P.F. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 18: 991-7, 1988.
- STANTON, T.B., JENSEN, N.S. Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. **J Bacteriol**, 175: 2980-7, 1993.
- STOCKIS, A., DE BRUYN, S., GENGLER, C., ROSILLON, D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 40: 221-7, 2002.
- STROMME, J.H. Effects of diethyldithiocarbamate and disulfiram on glucose metabolism and glutathione content of human erythrocytes. **Biochem Pharmacol**, 12: 705-15, 1963.
- SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., DELGADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MÜLLER, M., TACHEZY, J. Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 13: 10368-73, 2004.
- SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 22: 2156-61, 2007.
- SVÄRD, S.G., MENG, T.C., HETSKO, M.L., MCCAFFERY, J.M., GILLIN, F.D. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Microbiol**, 30: 979-89, 1998.
- TACHEZY, J., SÁNCHEZ, L.B., MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol Biol Evol**, 18: 1919-28, 2001.
- TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.
- TÉLLEZ, A., PALM, D., WEILAND, M., ALEMÁN, J., WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E., SVÄRD, S. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan women. **Parasite Immunol**, 27: 163-9, 2005.
- THOMPSON, R.C. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. **Vet Parasitol**, 9: 15-35, 2004.
- THOMPSON, R.C. Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools--towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int J Parasitol**, 32: 493-6, 2002.
- THOMPSON, R.C.A. *Giardiasis* as a re-emerging infections disease and its zoonotic potential. **Int. J. Parasitol**, 30: 1259-1267, 2000.
- THOMPSON, S.C. *Giardia lamblia* in children and the child care setting: a review of the literature. **J Paediatr Child Health**, 30: 202-9, 1994.

- THOMPSON, R.C.A, REYNOLDSON, J.A., MENDIS, A.H.W. *Giardia* and *Giardiasis*. **Adv. Parasitol.**, 32: 71-160, 1993.
- TONKIN, E.G., VALENTINE, H.L., ZIMMERMAN, L.J., VALENTINE, W.M. Parenteral N,N-diethylthiocarbamate produces segmental demyelination in the rat that is not dependent on cysteine carbamylation. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1: 139-50, 2003.
- TOWNSON, S.M., BOREHAM, P.F., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop**, 56: 173-94, 1994.
- UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, 14: 150-64, 2001a.
- UPCROFT, J.A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Ant. Ag. Chemoth**, 45: 1810-14, 2001b.
- UPCROFT, P., EDWARDS, R.M., UPCROFT, J.A., BROWN, D.M. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. **Int J Parasitol**, 28: 149-64, 1998.
- UPCROFT, J., UPCROFT, P. My favorite cell: *Giardia*. **Bioessays**, 20: 256-63, 1998.
- UPCROFT, J.A., CAMPBELL, R.W., UPCROFT, P. Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. **Parasitology**, 112: 309-13, 1996.
- UPCROFT, J.A., UPCROFT, P. Drug resistance and *Giardia*. **Parasitol Today**, 9: 187-90, 1993.
- UPCROFT, J.A., UPCROFT, P., BOREHAM, P.F. Drug resistance in *Giardia intestinalis*. **Int J Parasitol**, 20: 489-96, 1990.
- VON ALLMEN, N., BIENZ, M., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Experimental infections of neonatal mice with cysts of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. **Infect Immun**, 72: 4763-71, 2004.
- WASSMANN, C., HELLBERG, A., TANNICH, E., BRUCHHAUS, I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. **J Biol Chem**, 10: 26051-6, 1999.
- WEBSTER, B.H. Furazolidone in the treatment of giardiasis. **Am J Dig Dis**, 5: 618-22, 1960.
- WEINBACH, E.C., CLAGGETT, C.E., KEISTER, D.B., DIAMOND, L.S., KON, H. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. **J Parasitol**, 66: 347-50, 1980.
- WOLFE, M.S. Giardiasis. **N Engl J Med**, 9: 319-21, 1978.
- VOOGD, C.E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, 86: 243-77, 1981.
- WOO, P., PANAYI, G.S. Reactive arthritis due to infestation with *Giardia lamblia*. **J Rheumatol**, 11: 719, 1984.

WOOD, Z.A., SCHRODER, E. ROBIN HARRIS, J., POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, 28: 32-40, 2003.

WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, 2: 529-41, 2003.

WRIGHT, C. 4TH., VAFIER, J.A., LAKE, C.R. Disulfiram-induced fulminating hepatitis: guidelines for liver-panel monitoring. **J Clin Psychiatry**, 49: 430-4, 1988.

XIE, Z., KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, 9: 1102-9, 2007.

YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 281: 30299-304, 2006.

ZAAT, J.O., MANK, T.G., ASSENDELFT, W.J. A systematic review on the treatment of giardiasis. **Trop Med Int Health**, 2: 63-82, 1997.