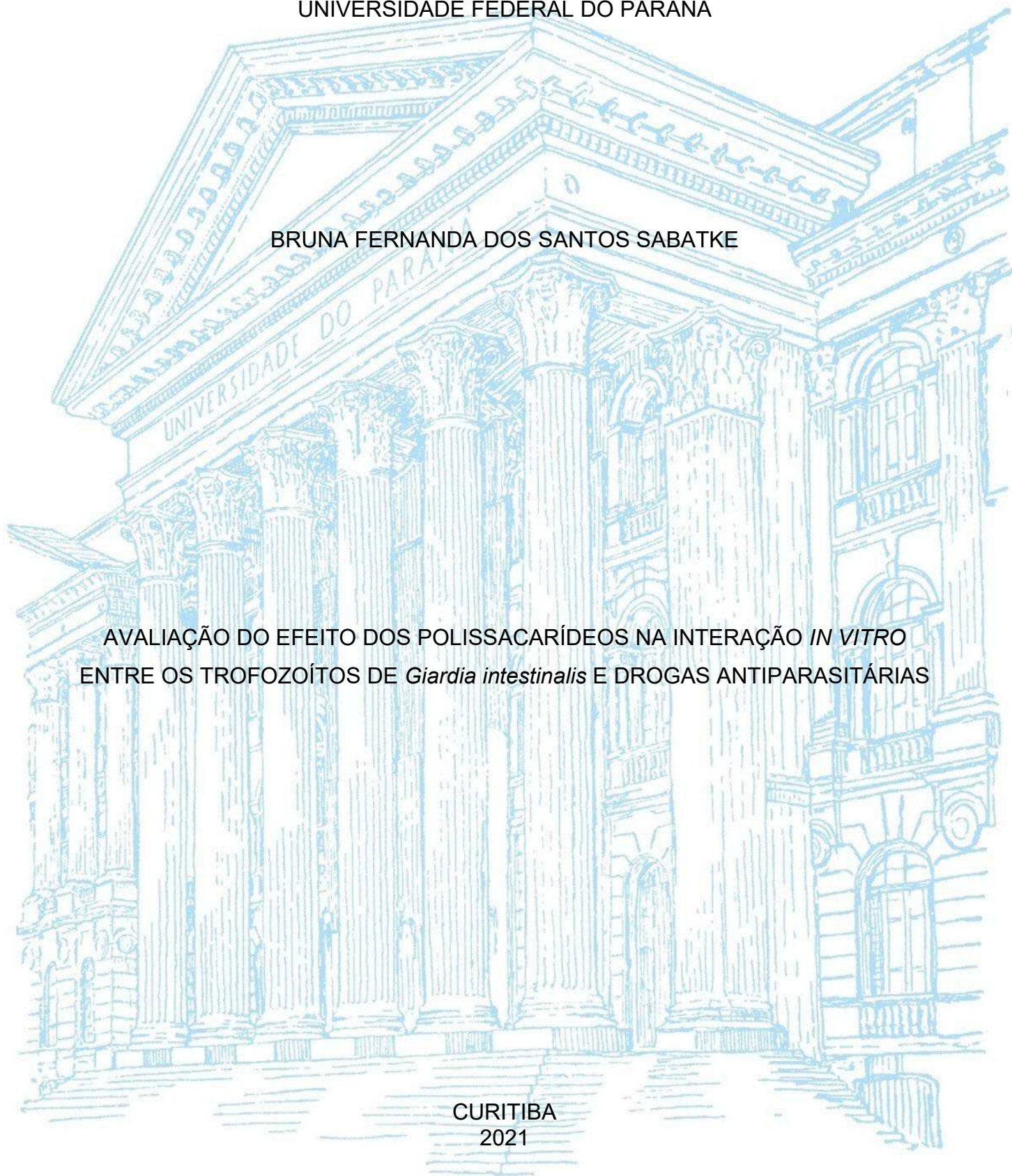


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA FERNANDA DOS SANTOS SABATKE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INTERAÇÃO *IN VITRO*  
ENTRE OS TROFOZOÍTOS DE *Giardia intestinalis* E DROGAS ANTIPARASITÁRIAS

CURITIBA  
2021



BRUNA FERNANDA DOS SANTOS SABATKE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INTERAÇÃO *IN VITRO*  
ENTRE OS TROFOZOÍTOS DE *Giardia intestinalis* E DROGAS ANTIPARASITÁRIAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

CURITIBA  
2021

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Sabatke, Bruna Fernanda dos Santos

Avaliação do efeito dos polissacarídeos na interação *in vitro* entre os trofozoítos de *Giardia intestinalis* e drogas antiparasitárias. / Bruna Fernanda dos Santos Sabatke. – Curitiba, 2021.

75 p.: il.

Orientador: Marcel Ivan Ramirez Araya.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Giardia. 2. Sinergismo. 3. Polissacarídeos. 4. Antiparasitários. 5. Camomila. I. Título. II. Ramirez Araya, Marcel Ivan. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

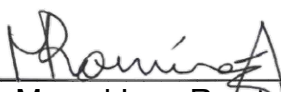
CDD (22. ed.) 616.34

## TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA FERNANDA DOS SANTOS SABATKE

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INTERAÇÃO *IN VITRO*  
ENTRE OS TROFOZOÍTOS DE *Giardia intestinalis* E DROGAS ANTIPARASITÁRIAS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



---

Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya  
Orientador – Departamento de Bioquímica, UFPR



---

Prof. Dra. Andréa Rodrigues Ávila  
Instituto Carlos Chagas (ICC)



---

Prof. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz  
Departamento de Parasitologia, UFPR

Curitiba, 10 de maio de 2021.

Dedico essa dissertação aos meus maiores incentivadores,  
à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Durante esses dois últimos anos muitas pessoas especiais e essenciais passaram pela minha vida, cada uma contribuindo da sua maneira para que hoje eu conseguisse chegar até aqui.

Sou muito grata ao universo por concluir essa etapa da minha formação, e por ter crescido tanto em tão pouco tempo.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, aos professores e servidores da instituição pela oportunidade de desenvolver o meu mestrado. Em especial, a Prof. Dra. Lucimara Cortes Cordeiro que gentilmente nos cedeu o laboratório de cultivo celular para a realização dos experimentos. E ao Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, chefe do laboratório de Genômica Funcional de Parasitos (GFP) por compartilhar conosco seu laboratório.

Sobretudo, sou imensamente grata ao meu orientador Dr. Marcel Ivan Ramirez, por essa oportunidade de aprendizado e crescimento. Obrigada por me receber no grupo, acreditar no meu trabalho. Você é uma grande inspiração para mim, não tenho como agradecer sua orientação, atenção, amizade, confiança e por me incentivar a enxergar além, despertando em mim a curiosidade e o deslumbramento sobre a construção do aprendizado científico.

Aos meus queridos colegas/amigos do grupo EVAHPI que me acompanharam nessa jornada, Bruno Gavinho, Izadora Rossi, Maria Alice Nunes, Cassio Idelan, meu muito obrigada, vocês foram grandes companheiros e foi um enorme prazer dividir tantas experiências com vocês. Especialmente ao Bruno, por ter me ensinado tão gentilmente a cuidar das nossas Giardias e a Izadora Rossi, uma grande amiga da qual tenho muito carinho e admiração, obrigada por seu incentivo, conselhos sábios e a alegria da convivência. Além dos colegas do grupo, meus agradecimentos aos colegas de laboratório do GFP, por sempre serem prestativos.

As minhas amigas da pós-graduação, Jordana, Roberta, Izadora e Maria Alice. vocês fizeram toda a diferença, me presenteando com boas lembranças.

Aos meus pais, João Arildo e Ana Paula que estiveram comigo durante toda vida e nessa jornada com todo amor e paciência me apoiando, meu mais que muito obrigada. Foram vocês que me ensinaram desde sempre que o conhecimento é nosso bem mais precioso.

Ao meu irmão João Pedro obrigada por sua amizade, conselhos sábios e piadas que tornam tudo mais leve.

Ao meu companheiro, Luiz Guilherme que me apoia em todas as ideias e sonhos. Obrigada pela paciência, amor, compreensão, por acreditar em mim e ser meu grande incentivador e motivador. Você foi essencial para completar essa etapa.

Ana Paula, João Arildo, João Pedro e Luiz Guilherme, vocês são meu bem mais precioso e sem vocês eu não chegaria até aqui.

Ao CNPQ pelo fornecimento da bolsa de estudos.

A todos que participaram da realização deste trabalho, colaborando para meu crescimento pessoal e profissional;

O meu mais sincero muito obrigada!

“A experiencia não é o que nos acontece, é o que fazemos com aquilo que nos acontece”.

Aldous Huxley



## RESUMO

*Giardia intestinalis* (sin. *G. lamblia* ou *G. duodenalis*) é um protozoário anaeróbio flagelado eucariótico. O parasita produz uma das mais frequentes diarreias de veiculação hídrica em todo o mundo, a giardíase. *Giardia* possui um ciclo monogênico e duas formas evolutivas: cistos e trofozoítos. Esse protozoário infecta a maioria dos mamíferos, incluindo o homem. Quando infecta o hospedeiro coloniza o intestino delgado, aderindo-se às células intestinais. O mecanismo pelo qual *Giardia intestinalis* causa diarreia e má absorção intestinal é multifatorial. No entanto os mecanismos da patogenicidade permanecem desconhecidos. O tratamento convencional da doença é realizado com metronidazol ou albendazol, porém esses medicamentos são tóxicos para o organismo e apresentam diversos efeitos colaterais. Além disso, vários estudos têm reportado casos de resistência dos parasitas. Uma estratégia de tratamento atual é combinar drogas com polímeros, macromoléculas ou polissacarídeos. Aqui testamos o efeito do polissacarídeo extraído da camomila a qual possui ação anti-inflamatória e é popularmente usada para distúrbios gastrointestinais. Apresentamos aqui dados sobre a suscetibilidade de *G. intestinalis* aos dois fármacos albendazol (ABZ) e nitazoxanida (NTZ) na presença de polissacarídeo extraído da camomila. Vimos que a combinação de 250 µg de camomila com albendazol ou nitazoxanida tornou a ação do medicamento mais eficaz. Além disso, observamos que a combinação das drogas com o polissacarídeo impediu os parasitas de se recuperarem e reestabelecerem uma nova curva de crescimento, gerando a possibilidade de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos do que os atuais.

Palavras-chave: *Giardia intestinalis*, sinergismo, polissacarídeos, drogas antiparasitárias, tratamento alternativo, camomila.

## ABSTRACT

*Giardia intestinalis* (syn. *G. lamblia* or *G. duodenalis*) anaerobic eukaryotic flagellate protozoan. The parasite produces one of the most frequent waterborne diarrhea in the world, giardiasis. *Giardia* has a monogenic cycle and two evolutionary forms: cysts and trophozoites. This protozoan infects most mammals, including man. When it infects the host, it colonizes the small intestinal, adhering to the intestinal cells. The mechanism by which *Giardia intestinalis* causes diarrhea and intestinal malabsorption is multifactorial. However, the mechanisms of pathogenicity remain unknown. Conventional treatment of the disease is performed with metronidazole or albendazole, but these drugs are toxic to the body and have several side effects. Furthermore, several studies have reported cases of parasite resistance. A current treatment strategy is to combine drugs with polymers, macromolecules, or polysaccharides. Here we test the effect of polysaccharides extracted from chamomile, which has anti-inflammatory action and is popularly used for gastrointestinal disorders. We present here data on the susceptibility of *G. intestinalis* to the two drugs albendazole (ABZ) and nitazoxanide (NTZ) in the presence of polysaccharides extracted from chamomile. We saw that the combination of 250 µg of chamomile with albendazole or nitazoxanide made the drug's action more effective. Furthermore, we observed that the combination of the drugs with the polysaccharide prevented the parasites from recovering and re-establishing a new growth curve, generating the possibility of more effective and less toxic treatments than the current ones.

Keywords: *Giardia intestinalis*, synergism, polysaccharides, antiparasitic drugs, alternative treatment, chamomile.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	MORFOLOGIA DOS TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis</i> ....	26
FIGURA 2 -	MORFOLOGIA DOS CISTOS DE <i>G. intestinalis</i> .....	28
FIGURA 3 -	CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA <i>G. intestinalis</i> .....	29
FIGURA 4 -	SELEÇÃO DO POLISSACARÍDEO COM POTENCIAL ANTIADERENTE. OS TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis</i> NA AUSÊNCIA (CTL) OU NA PRESENÇA DE 250 µG/ML CAMOMILA (MRW), AX-TUCUM (FTS-BF) E MARACUJÁ (FMS-HG) PREVIAMENTE TRATADOS POR DURANTE 2 HORAS COM POLISSACARÍDEO E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis</i> DURANTE 1 HORA. A QUANTIFICAÇÃO FOI REALIZADA ATRAVÉS DA CONTAGEM DE PARASITAS NÃO ADERIDOS PRESENTES NO SOBRENADANTE, UTILIZANDO UM HEMOCITÔMETRO.....	43
FIGURA 5 -	EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE CÉLULAS CACO-2. A) ADESÃO DOS TROFOZOÍTOS EM CÉLULAS CACO-2 NA PRESENÇA DE POLISSACARÍDEOS MRW E FMS-HG. B) PORCENTAGEM DE ADESÃO DOS TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis</i> AS CÉLULAS CACO-2 NA AUSÊNCIA (CTL) OU NA PRESENÇA DE 250 µG/ML CAMOMILA (MRW), E MARACUJÁ (FMS-HG).....	44
FIGURA 6 -	QUANTIFICAÇÃO DOS TROFOZOÍTOS NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS CACO-2 APÓS INCUBAÇÃO COM POLISSACARÍDEO MRW. TOTAL DE PARASITAS NÃO ADERIDOS EM CÉLULAS CACO-2, PREVIAMENTE INFECTADA COM <i>G. intestinalis</i> NA	

	AUSÊNCIA (CLT) E PÓS-TRATAMENTO DE 125, 250 E 500 µG/ML MRW.....	45
FIGURA 7 -	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Giardia</i> . O CRESCIMENTO DOS PARASITAS FOI AVALIADO APÓS SEREM INCUBADOS COM 250, 500 µg/ml DE POLISSACARÍDEO MRW. A QUANTIFICAÇÃO FOI REALIZADA POR CONTAGEM DIÁRIA DOS PARASITAS, POR MEIO DE UM HEMOCITÔMETRO. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM AVALIADOS ENTRE O CONTROLE E 250 E 500 µG/ML DE MRW.....	45
FIGURA 8 -	CRESCIMENTO DE CÉLULAS CACO-2 <i>IN VITRO</i> APÓS TRATAMENTO COM POLISSACARÍDEO MRW. O CRESCIMENTO FOI AVALIADO NAS CONCENTRAÇÕES 250, 500 E 1000 µg/mL.....	46
FIGURA 9 -	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS CACO-2 TRATADAS POR 72H COM POLISSACARÍDEO MRW ATRAVÉS DE ENSAIO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPANO.....	47
FIGURA 10 -	RESPOSTA INIBITÓRIA DE DROGAS ANTIPARASITARIAS EM TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis IN VITRO</i> . A) PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO A NITAZOXANIDA. B) PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DOS PARASITAS APÓS EXPOSIÇÃO AO ALBENDAZOL.....	47
FIGURA 11 -	EFEITOS SINÉRGICOS <i>IN VITRO</i> ENTRE NITAZOXANIDA E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> APÓS 72 HORAS.....	49

FIGURA 12 -	EFEITOS SINÉRGICOS <i>IN VITRO</i> ENTRE NITAZOXANIDA E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> APÓS 72 HORAS.....	49
FIGURA 13 -	EFEITO SINÉRGICO <i>IN VITRO</i> ENTRE NITAZOXANIDA E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> APÓS 72 HORAS.....	51
FIGURA 14 -	RESPOSTA <i>IN VITRO</i> DA COMBINAÇÃO DE ALBENDAZOL E POLISSACARÍDEO MRW CONTRA <i>G. intestinalis</i> APÓS 72H DE TRATAMENTO.....	51
FIGURA 15 -	RESPOSTA <i>IN VITRO</i> DA COMBINAÇÃO DE ALBENDAZOL E POLISSACARÍDEO MRW CONTRA <i>G. intestinalis</i> .....	52
FIGURA 16 -	RESPOSTA <i>IN VITRO</i> DA COMBINAÇÃO DE ALBENDAZOL E POLISSACARÍDEO MRW CONTRA <i>G. intestinalis</i> .....	52
FIGURA 17 -	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA DROGA ALBENDAZOL SOBRE <i>G. intestinalis</i> DURANTE 72H DE EXPOSIÇÃO....	53
FIGURA 18 -	EFEITO SINÉRGICO <i>IN VITRO</i> ENTRE ALBENDAZOL E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> APÓS 72 HORAS.....	53
FIGURA 19 -	EFEITO SINÉRGICO <i>IN VITRO</i> ENTRE ALBENDAZOL E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> APÓS 72 HORA .....	54
FIGURA 20 -	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> EXPOSTA AO POLISSACARÍDEO MRW E NITAZOXANIDA.....	55

FIGURA 21-	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE <i>G. intestinalis</i> EXPOSTA		
	AO POLISSACARÍDEO MRW E		
	NITAZOXANIDA.....		56

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ESPÉCIES E ASSEMBLAGES DE <i>Giardia intestinalis</i> E SEUS PRINCIPAIS HOSPEDEIROS.....	17
TABELA 2 –	SUSCEPTIBILIDADE DE <i>G. intestinalis</i> AO TRATAMENTO COM O IC50 DE CADA UMA DAS DROGAS INDIVIDUALMENTE.....	43
TABELA 3 –	SUSCEPTIBILIDADE DE <i>G. intestinalis</i> AO TRATAMENTO DE ALBENDAZOL E NITAZOXANIDA, INDIVIDUALMENTE E EM COMBINAÇÃO COM POLISSACARÍDEO MRW.....	44

## LISTA DE SIGLAS

5-NIs	-	5-Nitroimidazóis
ATP	-	Adenosina trifosfato
ABZ	-	Albendazol
BIs	-	Benzimidazóis
IC50	-	Concentração inibitória de 50%
GDH	-	Glutamato desidrogenase
GALNAC	-	N-acetilgalactosamina
NAD	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NTZ	-	Nitazoxanida
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
NO	-	Oxido nítrico
PFOR	-	Piruvato ferredoxina oxidoreductase
MRW	-	Polissacarídeo extraída da camomila
FMS-HG	-	Polissacarídeo extraída do maracujá
FTS-BF	-	Polissacarídeo extraído do AX-TUCUM
CWP	-	Proteínas da parede do cisto
VSP	-	Proteínas variáveis de superfície
IBS	-	Síndrome do Intestino Irritado
SIN	-	Sinonímia
SAB	-	Soro adulto bovino
SFB	-	Soro fetal bovino



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{M}$  - micromolar

$\mu\text{g}$  - microgramas

ml - mililitros

$\text{O}_2$  - oxigênio

$\text{CO}_2$  - dióxido de carbono

% - porcentagem

kDa – kilodaltons

$\alpha$  - alfa

B - beta

$\gamma$  - gama

$\delta$  - ômega

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 <i>GIARDIA</i> .....	21
2.2 HISTÓRICO .....	22
2.3 EPIDEMIOLOGIA .....	23
2.4 BIOLOGIA DO PARASITA.....	24
2.4.1 ESTRUTURA DOS TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis</i> .....	26
2.4.2 ESTRUTURA DOS CISTOS DE <i>G. intestinalis</i> .....	27
2.4.3 CICLO BIOLÓGICO DE <i>G. intestinalis</i> .....	29
2.4.4 EXCISTAÇÃO E ENCISTAÇÃO .....	29
2.6 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA.....	31
2.7 DIAGNÓSTICO .....	32
2.8 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	33
2.9 POLISSACARÍDEOS: NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS.....	36
3 OBJETIVOS .....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 CULTURA DE <i>G. intestinalis</i> .....	40
4.2 CULTURA DE CÉLULAS CACO-2 .....	40
4.3 POLISSACARÍDEOS .....	40
4.4 ENSAIO DE ADESÃO DOS POLISSACARÍDEOS EM CÉLULAS CACO-2.....	41
4.5 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS.....	41
4.6 ENSAIO DE SINERGISMO ENTRE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS E POLISSACARÍDEO MRW .....	41

4.7 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DOS TROFOZOÍTOS DE <i>G. intestinalis</i> .....	42
4.8 VIABILIDADE CELULAR .....	42
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	42
5 RESULTADOS .....	43
5.1 SCREENING DE POLISSICARÍDEOS .....	43
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO POLISSARÍDEO MRW .....	44
5.3 AVALIAÇÃO DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS INDIVIDUALMENTE.....	47
5.4 SINERGISMO ENTRE DROGAS ANTIPASITÁRIAS E POLISSACARÍDEO MRW .....	48
5.5 RECUPERAÇÃO DE CULTURA DOS PARASITAS.....	55
6 DISCUSSÃO .....	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	60
8 PERSPECTIVAS.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

*Giardia intestinalis* (sin. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*) é um protozoário flagelado que em hospedeiros mamíferos localiza-se no intestino delgado. É agente causador de uma das doenças diarreicas parasitárias mais comuns em todo o mundo, a giardíase (Adam, 2001). Estima-se 280 milhões de infecções anualmente, os casos ocorrem predominantemente nos países em desenvolvimento com condições sanitárias precárias (EINARSSON; MA'AYEH; SVÄRD, 2016; KULAKOVA et al., 2014).

Esse parasita tem dois estágios evolutivos em seu ciclo de vida, cisto e trofozoítos. A transmissão ocorre através da ingestão de cisto com água ou alimentos contaminados ou por meio de contato fecal-oral direto. O trofozoíto é a forma vegetativa e se replica no intestino delgado (ADAM, 2001). As infecções de *Giardia* frequentemente ocorrem sem sintomas ou são autolimitantes. Quando presentes, os sinais clínicos podem incluir náusea, perda de peso, inchaço, dor abdominal e diarreia (COTTON et al., 2011; ANKARKLEV et al., 2010).

A fisiopatologia da giardíase é multifatorial e envolve processos parasitários, hospedeiros, alimentares, além de processos imunológicos e fatores ambientais (BURET et al., 2015). Existem medicamentos convencionais com diferenças na eficácia no tratamento da giardíase. Os compostos mais usados são derivados de 5-nitroimidazóis (5-NIs) e benzimidazóis (BIs), quinacrina, furazolidona, paromomicina e nitazoxanida (LALLE; HANEVIK, 2018). Esses agentes têm modos de ações distintas e envolvem uma variedade de marcação e mecanismos de processamento que afetam os processos celulares do trofozoíto (ARGÜELLO-GARCÍA et al., 2020). Paromomicina e quinacrina são eventualmente usados para tratar a giardíase, mas apresentam limitações devido à baixa eficácia e alta toxicidade (ESCOBEDO E CIMERMAN, 2007). A eficácia do tratamento com metronidazol varia entre 73 a 100% e de 79 a 100% para albendazol (GARDNER E HILL, 2001; SOLAYMANI-MOHAMMADI et al., 2010). No entanto, esses agentes estão frequentemente associados a efeitos colaterais adversos e falhas terapêuticas tem ocorrido com maior frequência, devido à baixa adesão à

quimioterapia, imunossupressão, deficiência imunológica, reinfecção ou resistência a medicamentos aos compostos relacionados ao metronidazol (LEITSCH, 2015; LALLE; HANEVIK, 2018; UPCROFT; UPCROFT, 2001). Portanto, há um interesse crescente em buscar novas estratégias e desenvolvimento de agentes contra *Giardia*, não tóxicos e que não causem resistência dos parasitas (NASH et al., 2001).

A combinação de substâncias com efeito sinérgico tem sido utilizadas para aumentar eficiência e diminuir os efeitos colaterais das drogas anti-giardiais (VELÁZQUEZ-OLVERA et al., 2016).

Recentemente, estudos tem demonstrado que os polissacarídeos, polímeros de alto peso molecular de diferentes estruturas e funções, extraídos de produtos naturais possuem efeitos terapêuticos e propriedades benéficas, como atividade antitumoral, atividade antioxidante, atividade anticoagulante, atividade antidiabética, atividade antiviral e imunomoduladora (CHO et al., 2015; LI et al., 2012; LI et al., 2012; SHI, 2016; WANG et al., 2016). Portanto, esse trabalho tem como objetivo avaliar a combinação dos polissacarídeos e drogas antiparasitas, que poderiam aumentar a eficiência e diminuir a toxicidade dos compostos antiparasitários no tratamento da giardíase.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Giardia*

*Giardia intestinalis* (sin. *G. duodenalis* ou *G. lamblia*) é um microrganismo anaeróbico unicelular, flagelado e eucariótico. É agente etiológico da giardíase, conhecido como diarreia do viajante, uma das mais comuns infecções parasitárias que causam diarreia e afetam milhares de pessoas no mundo todo (ANKARKLEV et al., 2010). Este parasita quando infecta o hospedeiro habita o intestino de diversos vertebrados, como aves, anfíbios, mamíferos, incluindo humanos (ADAM, 2001).

Estima-se que ocorram anualmente, em todo o mundo, cerca de 280 milhões de novos casos (LANE & LLOYD, 2002). Em 2004, a giardíase, em função de seu potencial zoonótico e propagação antroponótica, foi incluída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no grupo das em Doenças Tropicais Negligenciadas (SAVIOLI et al, 2006). Essa doença têm uma forte prevalência em países em desenvolvimento com condições sanitárias precárias, sobretudo relacionadas ao tratamento de água e esgoto (EINARSSON, MA'AYEH, SVÄRD, 2016).

Este protozoário, taxonomicamente pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Diplomonadida e Família Hexametidae. Atualmente classificado como parte do supergrupo Excavata (ANKARKLEV et al., 2010).

O parasita é classificado em oito grupos (A – H) geneticamente distintos, denominados *assemblages* (sin. genótipos; grupos) no entanto são morfologicamente idênticos (CACCIÒ E RYAN, 2008). A prevalência de cada genótipo varia de país para outro e parece ter um hospedeiro específico (CACCIÒ et al., 2005; FENG E XIAO, 2011). Os genótipos A e B, considerados zoonóticos são grupos geneticamente diversos e, por esse motivo são divididos em subgrupos. As *assemblages* C e D foram identificadas em cães, gatos, coiotes e lobos, *assemblages* E em bovinos, ovelhas, cabras, porcos, búfalos e muflons, e *assemblages* F e G em gatos e ratos. Recentemente Lasek-

Nesselquist e colaboradores (2010) divulgaram o conjunto H, identificado em focas (*Halichoerus grypus*) e gaivotas (*Larus argentatus*).

TABELA 1 – ESPÉCIES E ASSEMBLAGES DE *Giardia intestinalis* E SEUS PRINCIPAIS HOSPEDEIROS.

Espécies/ assemblages	Hospedeiro
<i>Assemblage A</i>	Humanos, primatas, ruminantes domésticos e selvagens, alpacas, suínos, cavalos, cães domésticos e selvagens, gatos, furão, roedores, marsupiais
<i>Assemblage B</i>	Humanos, primatas, gados, cães, cavalos, coelhos, roedores silvestres
<i>Assemblage C</i>	Cães, gatos, coiotes e lobos
<i>Assemblage D</i>	Cães, gatos, coiotes e lobos
<i>Assemblage E</i>	Bovinos, ovelhas, cabras, porcos, búfalos e muflons
<i>Assemblage F</i>	Gatos
<i>Assemblage G</i>	Ratos
<i>Assemblage H</i>	Focas e gaivotas

FONTE: FENG E XIAO (2011).

## 2.2 HISTÓRICO

A taxonomia e classificação do parasita tem sido aceitas de acordo com a origem do hospedeiro ou por aspectos morfológicos (ADAM, 2001). De acordo com Dobell (1920), o protozoário foi inicialmente descrito em 1861 por Van Leeuwenhoek, ao examinar suas próprias amostras de fezes diarreicas no microscópio. Uma descrição mais detalhada do parasito foi realizada por Lambl, em 1859, que o classificou dentro do gênero *Cercomonas* e denominou a espécie de *Cercomonas intestinalis* (LAMBL, 1859). A primeira descrição do cisto de *Giardia*

ocorreu em 1879, por Grassi, que identificou os cistos nas fezes de roedores, porém, acreditou que eram estruturas provenientes de coccídios (MEYER E JARROL, 1980). A nomenclatura de *Giardia* foi utilizada primeiramente por Kunstler em 1882, que descreveu um organismo encontrado em anfíbio (provavelmente *Giardia agilis*); e seis anos após, Blanchard sugeriu o nome *Lamblia intestinalis*. Finalmente, em 1902, Stiles alterou o nome do parasito para *G. duodenalis*. Porém, Kofoid e Christiansen propuseram o nome *G. lamblia* em 1915 e *Giardia entérica* em 1920, respectivamente. Atualmente, a nomenclatura aceita para a espécie é *G. duodenalis*, *G. lamblia* ou *G. intestinalis* (MONIS et al., 2009).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

Em países desenvolvidos, estima-se que a prevalência da giardíase seja de 2-5% na população, enquanto nos países em desenvolvimento, a prevalência estimada da doença é de 20-30% (SOUSA et al., 2006).

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

No Brasil, a giardíase é encontrada em todas as regiões. Entretanto, não existe uma investigação nacional que apresente as prevalências da infecção no país. Os dados disponíveis são frutos de estudos individuais e seccionais predominantemente na região sudeste, onde as prevalências podem alcançar cifras de 78,3% e 69,6%, como relatados em estudos realizados em Minas Gerais e São Paulo, respectivamente. Nas demais regiões, prevalências maiores que 30%



também foram encontradas nos estados do Maranhão, Amapá, Sergipe e Paraná (COELHO et al. 2017).

Um estudo sobre a prevalência da giardíase em Botucatu, São Paulo, uma das pesquisas revelou que crianças que frequentavam creches, em que estudos sobre a prevalência de giardíase revelaram positividade para *G. intestinalis* em cerca de 26,9% das crianças (DE CARVALHO et al., 2006).

No estado do Paraná, Pittner et al. (2007) pesquisaram a presença de enteroparasitose em crianças de uma comunidade da cidade de Guarapuava. Por meio de exames de fezes, foi identificada a presença de *G. intestinalis* em 50,73% das amostras.

#### 2.4 BIOLOGIA DO PARASITA

Esse parasita já foi considerado um dos primeiros eucariotos divergentes, por apresentar algumas características estruturais únicas, como: 1) ausência de algumas organelas celulares comuns entre os eucariotos (por exemplo, mitocôndria, peroxissomos) e um sistema de endomembranas pouco desenvolvido; 2) as vias metabólicas do tipo procarionte; 3) Divergência genômica. Devido as peculiaridades celulares, bioquímicas e genômicas esse modelo foi considerado um “fóssil biológico” (YE et al., 2017; EMBLEY et al, 2003). Entretanto, a ausência de mitocôndria foi amparada pela descoberta de genes nucleares de ascendência mitocondrial em *Giardia* e a identificação de organelas mitocondriais remanescentes em protistas amitocondriais (TOVAR et al., 2003); a semelhança metabólica com os procariontes evidenciou ser resultado da transferência horizontal de genes; e a posição basal sobre a estrutura molecular na árvore filogenética atribuída em decorrência da atração por ramos longos (YE et al., 2017). Isso ampara a ideia de que *Giardia* provavelmente não é um eucarioto primitivo primário, mas reduzido secundariamente (CERNIKOVA et al., 2018).

Diferentemente de outros eucariotos, que metabolizam os carboidratos de forma aeróbica, as espécies de *Giardia*, *Trichomonas* e *Entamoeba* utilizam o metabolismo fermentativo (inclusive na presença de oxigênio) para obtenção de energia. A geração de ATP (adenosina trifosfato) através da via glicolítica depende

apenas da fosforilação oxidativa ao nível de substrato (ADAM, 2001; GILLIN et al, 1996). O nível de fosforilação do substrato modula a glicólise e a geração de ATP. A conversão do piruvato a acetilcoenzima A é catalisada pela enzima piruvato ferredoxina oxirredutase, que utiliza a ferredoxina e NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleotídeo) como acceptor de elétrons. O complexo enzimático piruvato ferredoxina oxidorredutase (PFOR) e a proteína ferredoxina são essenciais para a produção de energia em micro-organismos anaeróbicos. A glicose não é totalmente oxidada formando acetato, alanina, etanol e CO<sub>2</sub>. O balanço final dos produtos é dependente da tensão de O<sub>2</sub> e da concentração de glicose no meio. Assim como os carboidratos, os aminoácidos são importantes componentes no metabolismo energético do parasita (ADAM, 2001).

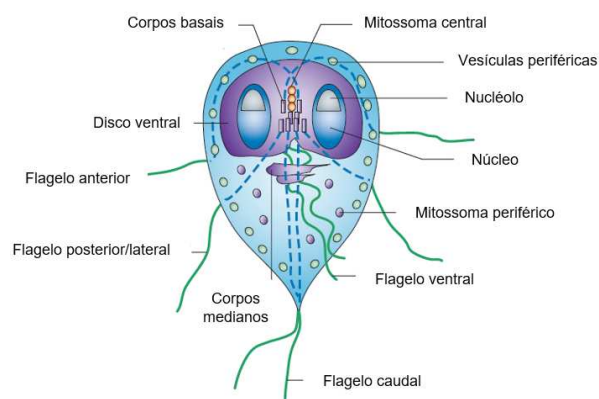
Alguns patógenos, incluindo *Giardia* utilizam mecanismos diferentes para mudar a expressão de seus antígenos de superfície para manter infecções crônicas sob a pressão imune contínua gerada por seus hospedeiros, esse mecanismo é conhecido como variação antigênica. Em *Giardia*, a variação antigênica é responsável pela variável e/ou persistência curso de algumas infecções, bem como a propensão a múltiplas reinfecções, e envolve uma família de proteínas variáveis de superfície (VSP, na sigla em inglês). Os VSPs cobrem toda a superfície do trofozoíto e são os principais antígenos reconhecidos por o sistema imunológico do hospedeiro. Os VSPs variam em tamanho de 30kDa a 200kDa; eles possuem uma região amino-terminal variável rica em cisteína e uma região carboxi-terminal que inclui uma transmembrana hidrofóbica domínio e cauda citosólica curta. O genoma do parasita codifica um repertório de cerca de 190 genes VSP, mas apenas um VSP é expresso a qualquer dado tempo na superfície de trofozoítos individuais. Mudando para a expressão de outro VSP ocorre uma vez a cada 6 a 13 gerações, mesmo em a ausência de pressão imunológica. Semelhante à maioria dos outros genes de *Giardia*, os genes VSP não possuem íntrons e suas 59 regiões a montante são relativamente curtas. Além disso, não existem promotores eucarióticos típicos presentes nessas regiões. Até agora, nem os processos de rearranjo de genes nem mecanismos de ativação/desativação dependentes do promotor foram demonstrados estar envolvido na troca antigênica do parasita. A regulação da

expressão de VSP envolve um sistema compreendendo RNA polimerase dependente de RNA, Dicer e Argonaute, componentes conhecidos do mecanismo de interferência de RNA. Os clones que expressam um único antígeno de superfície transcrevem eficientemente vários genes de VSP, mas apenas acumulam transcritos que codificam o VSP a ser expresso. A detecção de RNAs antisense correspondentes aos genes VSP e pequenos RNAs do gene silenciado, mas não para o VSP expresso, implica a via de interferência do RNA na variação antigênica (PRUCCA et al., 2008).

#### 2.4.1 ESTRUTURA DOS TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis*

Os trofozoítos de *G. intestinalis* são formas replicativa e não invasivas que aderem na mucosa do intestino delgado e são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Apresentam uma forma piriforme, arredondada na região anterior e afilado na região caudal, medem de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 5 a 15  $\mu\text{m}$  de largura e 4  $\mu\text{m}$  de espessura (GILLIN et al, 1996; ADAM, 2001) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DOS TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis*.



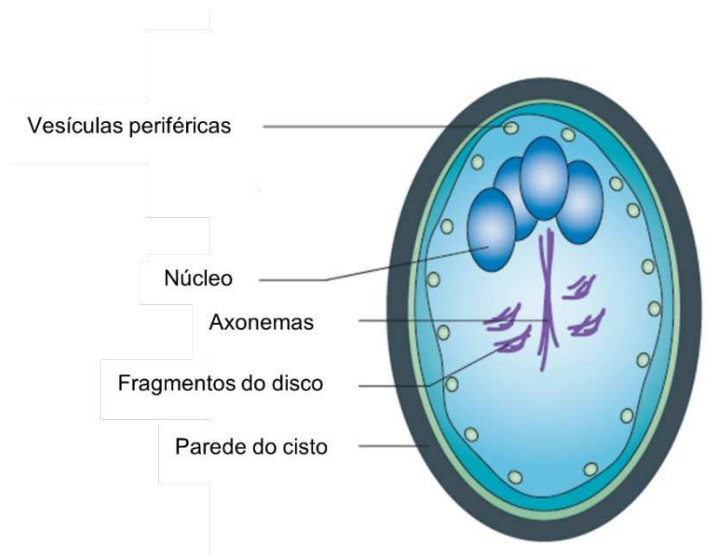
FONTE: Adaptado de Ankarklev et al. (2010).

Para a fixação no epitélio intestinal do hospedeiro, o trofozoítio possui um citoesqueleto complexo que determina o formato do parasito e âncora os quatro pares de flagelos presentes no corpo celular onde emergem ventralmente, anterior-lateralmente, posterior-lateralmente e caudalmente, oriundos do corpo mediano e do

disco ventral. Os corpos basais são os sítios de onde geram os flagelos. Os flagelos são fundamentais para sobrevivência do parasito no hospedeiro, uma vez que promovem a mobilidade dos trofozoítos e auxiliam no processo de ligação mecânica entre o trofozoíto e os enterócitos no intestino (ADAM, 2001). Além das estruturas citadas, os trofozoítos de *G. intestinalis* possuem, dois axonemas de flagelo e o material genético deste parasito está dividido em dois núcleos, dois nucléolos ovalados, rodeados por envelopes nucleares, com replicação simultânea, medidas de 1  $\mu$ m de diâmetro cada, localizados na metade anterior da célula, com divisão por bipartição (SOLARI et al., 2003). Os dois corpos medianos presentes em formato de vírgula, são componentes do citoesqueleto, equivalentes a uma estrutura desordenada de microtúbulos posterior aos dois núcleos (ELMENDORF; DAWSON; MCCAFFERY, 2003; DAWSON et al., 2010). No lado anterior ventral dos trofozoítos, a estrutura conhecida por disco ventral ou disco adesivo, também compõe o citoesqueleto, estando ligada à membrana plasmática por pequenas fibras compostas por  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, proteínas contráteis e proteínas da família das giardinas ( $\alpha$ - giardina,  $\beta$ - giardina,  $\gamma$ - giardina e  $\delta$ - giardina). Um dos papéis do disco ventral está relacionado à sucção promovida para aderência dos trofozoítos no epitélio das microvilosidades intestinais (SOLARI et al., 2003; BENCHIMOL, 2004). No citoplasma são encontrados também, de forma homogênea, vesículas periféricas, lisossomos, ribossomos e grânulos de glicogênio distribuídos na região dorsal da célula. O retículo endoplasmático é projetado da região perinuclear até a região das vesículas periféricas do dorso da célula (MAIA et al., 2008).

#### 2.4.2 ESTRUTURA DOS CISTOS DE *G. intestinalis*

Os cistos de *Giardia spp.* são responsáveis pela propagação da infecção em novos hospedeiros. Quando maduro, o cisto possui um formato oval, medindo de 8 a 12  $\mu$ m de comprimento por 7 a 10  $\mu$ m de largura, envolto por uma parede externa de aproximadamente 0,3 a 0,5  $\mu$ m de espessura proporcionando resistência e o proteção a condições ambientais desfavoráveis. Dentro do cisto é possível visualizar 2 a 4 núcleos, corpos basais, corpos medianos e presença de grânulos de glicogênio (FIGURA 2) (ADAM, 2001).

FIGURA 2 – MORFOLOGIA DOS CISTOS DE *G. intestinalis*

FONTE: Adaptado de Ankarklev et al. (2010).

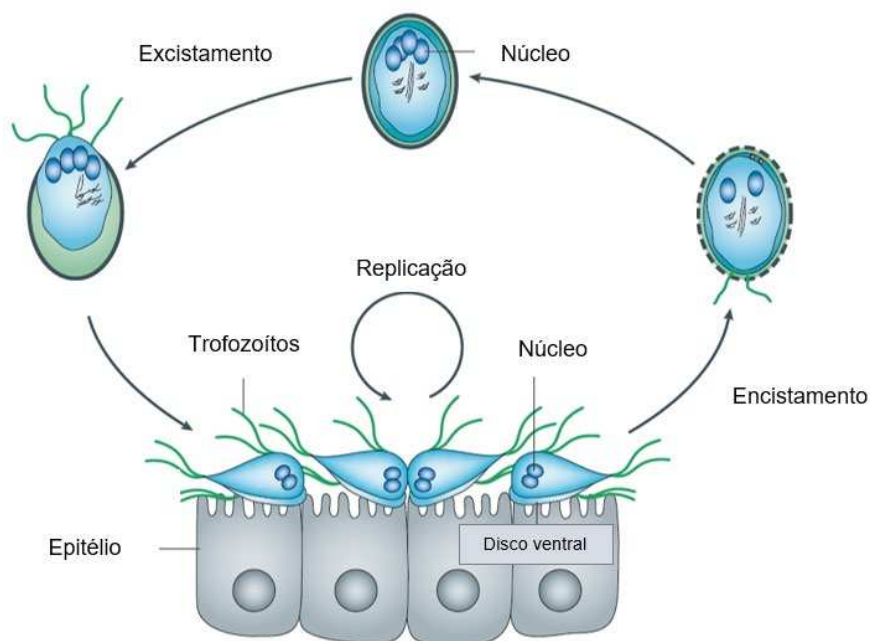
A forma cística é encontrada nas fezes diarreicas do hospedeiro e no meio ambiente, permanecendo viáveis até 60 dias na superfície da água com temperatura até 4°C e resistir aos processos de tratamentos de água mais simples (dióxido de cloro, cloraminas), devido a presença da parede cística (MONIS; ANDREWS; MAYRHOFER; EY, 2003).

A camada interna dos cistos apresentam duas membranas que atuam na proteção do parasito, delimitando o espaço periplasmático. A parede externa contém, componentes derivados do açúcar, principalmente galactosamina em forma de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) e proteínas originadas da parede do cisto (CWPs – do inglês “Cyst Wall Protein”) (KARR; JARROLL, 2004). As principais CWPs identificadas são: CWP1, CWP2 e CWP3, as quais possuem repetições ricas em leucina e resíduos de cisteína conservados. O cisto é composto de 60% de carboidratos e 40% de proteínas. As fortes interações entre os carboidratos dos açúcares e as CWPs fazem com que o mesmo resista à lise hipotônica, ao ácido gástrico e às inúmeras adversidades encontradas no ambiente externo, onde o metabolismo do cisto é desacelerado e o mantém dormente (LUJAN et al, 1997; PAGET; MACECHKO; JARROLL, 1998).

### 2.4.3 CICLO BIOLÓGICO DE *G. intestinalis*

O protozoário *Giardia* tem um ciclo biológico bastante simples e apresenta dois estágios evolutivos diferentes: trofozoítos e cistos. Os trofozoítos são a forma replicativa e não infecciosa, presente no intestino delgado, enquanto os cistos, são a forma resistente do parasita, permitindo a sobrevivência condições ambientais diversas. A infecção de um hospedeiro inicia-se quando o cisto é ingerido com água contaminada ou, menos comumente, alimento ou por contato direto oral-fecal. Após a exposição ao ambiente ácido do estômago, os cistos são expelidos em trofozoítos no intestino delgado proximal. Após a exposição ao fluido biliar, alguns dos trofozoítos formam cistos no jejuno e são eliminados nas fezes, permitindo que um novo ciclo de transmissão ocorra (ADAM, 2001; A ESCOBEDO et al., 2014).

FIGURA 3 - CICLO BIOLÓGICO DO PARASITA *G. intestinalis*



FONTE: Adaptado de Ankarklev et al. (2010).

### 2.4.4 EXCISTAÇÃO E ENCISTAÇÃO

O processo conhecido como excistação é a liberação dos trofozoítos internos no cisto, e ocorre após a ingestão de cistos viáveis por um indivíduo. O cisto

dormente torna-se metabolicamente ativo e sofre excitação quando é exposto a alta concentração de hidrogênio ( $H^+$ ) presente no estômago e finalizado durante a exposição ao conteúdo da porção proximal do intestino delgado. Neste local ocorre a ruptura em um dos polos do cisto, a qual é auxiliada por proteases pancreáticas e pelo pH levemente alcalino do duodeno. Os flagelos são os primeiros a aparecer quando emergem de um dos polos abertos no cisto, seguidos do corpo do excizoíto (ADAM, 2001). Excizoítos é o nome dado às formas ovais de trofozoítos encistados com quatro núcleos, os quais dividem-se rapidamente e subsequentemente sofrem divisão celular completa originando quatro trofozoítos binucleados (BERNANDER; PALM; SVARD, 2001). A atividade da proteína-quinase A e a sinalização de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), além da fosforilação e desfosforilação de proteínas chaves, vêm sendo citados por desempenharem papéis de importância no processo de excitação (HETSKO et al., 1998; ADAM, 2001; CARRANZA e LUJAN, 2010).

O encistamento é o processo pelo qual o trofozoíto perde a motilidade e passa para o estado não móvel. Esse processo é desencadeado devido ao surgimento de um ambiente hostil ao trofozoíto, isto é, ocorre aumento no nível da bile, redução do colesterol e surgimento de um pH mais alcalino. Durante o processo de encistamento, o trofozoíto passa por mudanças morfológicas e moleculares, com a indução de genes específicos, como os que codificam as proteínas CWPs e enzimas relacionadas com a síntese de carboidratos presentes na parede do cisto. A via de encistação giardial é um mecanismo de virulência essencial cujo objetivo é diferenciação em uma forma que possa sobreviver no ambiente e infectar um novo hospedeiro. A construção da parede extracelular do cisto (CWP) é primordial, pois permite o parasita persistir em água doce, resistir a desinfetantes, passar pelo estômago do novo hospedeiro e infectar no intestino delgado. Essa estrutura fibrosa de 300 nm de espessura exclui pequenas moléculas como a água, mas transmite os estímulos fisiológicos que regulam a excitação. É um modelo matriz extracelular com funções de proteção e sinalização. A encistação é uma transformação gradual do binucleado móvel (4N), móvel, com forma de meia-pera trofozoíto. Os trofozoítos perdem a capacidade de anexar; o disco de conexão fragmentos e os flagelos são internalizados. O metabolismo também diminui à medida que as células se

acumulam e insira dormência. O cisto oval, imóvel, quadrinucleado (16N) está envolto no refratário CW que contém proteína (CWP) e glicopolímero (CWG) em fibrilas insolúveis. A síntese do CWP começa no início da encistação e leva à formação de novas vesículas secretórias específicas para encistação (ESV), que exportam CWP (LAUWAET et al., 2007). Logo, o encistamento do parasito contribui para evasão do sistema imune por dois caminhos diferentes: o primeiro, a parede do cisto cobre a superfície do trofozoíto durante o encistamento de forma a isolá-lo dos mecanismos imunes do hospedeiro. No segundo, o encistamento leva a alteração das proteínas de superfície variantes (VSPs) (LAROCQUE et al., 2003; ANKARKLEV et al., 2010). A carência de colesterol é o gatilho para desencadear a diferenciação dos trofozoítos em cistos. Os trofozoítos de *Giardia* não sintetizam colesterol, obtendo-o da porção duodenal do intestino delgado do hospedeiro. Portanto, durante a passagem dos trofozoítos nas porções finais do intestino delgado do hospedeiro, perante a privação de colesterol no microambiente, inicia-se o processo de encistamento (LUJÁN, MOWATT, NASH, 1997).

## 2.6 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA

As manifestações clínicas da *G. intestinalis* são muito variáveis entre os indivíduos infectados e costuma ser assintomática na maioria dos casos (SOLOMONS, 1982). Dentre as características clínicas da infecção, as que se destacam são: dor abdominal, náusea, vômito, perda de peso (ECKMANN, 2003), inchaço, diarreia com ou sem a síndrome de má absorção, desidratação, má digestão, flatulência, esteatorréia, urticária e sensibilidade contra os antígenos alimentares (PRISCO et al., 1998). A giardíase tende a ser autolimitante em indivíduos imunocompetentes, entretanto, em crianças, a infecção aguda pode ocasionar anorexia, falhas no crescimento físico e cognitivo e no estado nutricional (BERKMAN et al., 2002).

A fisiopatologia da giardíase ocorre sem que haja invasão dos trofozoítos no epitélio intestinal. Além disso, a infecção é multifatorial e envolve fatores ligados ao parasito e hospedeiro como, processos imunológicos e não imunológicos da mucosa. A doença também pode estar associada a distúrbios gastrointestinais



crônicos como a Síndrome do Intestino Irritado (IBS), aliados ou não a patologias extra intestinais ainda que os parasitos permaneçam no interior do trato gastrointestinal (DIZDAR; GILJA; HAUSKEN, 2007; COTTON; BEATTY; BURET, 2011). Paralelamente à adesão dos trofozoítos nas células epiteliais, ocorre uma série de eventos os quais se interligam na produção da diarreia, assim, incluímos a alta taxa de apoptose dos enterócitos, a disfunção da barreira intestinal, o encurtamento da borda em escova das microvilosidades, acompanhados ou não da atrofia das vilosidades, as deficiências de dissacaridases, a ativação de linfócitos do hospedeiro, a hipersecreção de ânion e o aumento do trânsito intestinal, exemplificam os estágios da disfunção intestinal (BURET; GALL; OLSON, 1991; WOLFE, 1992; COTTON et al., 2011).

O aumento da permeabilidade intestinal mediado pelo parasito é resultado das alterações ocorrentes nos complexos juncionais apicais, que inclui interrupções de F-actina, ZO-1, claudina-1 e  $\alpha$ -actina, um dos componentes do anel de actomiosina que regula o fluxo paracelular (SCOTT et al., 2002; TROEGER et al., 2007; MAIA-BRIGAGÃO; MORGADO-DÍAZ; SOUZA, 2012). Durante a infecção pode ocorrer a redução da área total de absorção, seguida ou não da atrofia das vilosidades, o que representa um fator importante para diarreia via má-absorção de vitamina B12, ferro, sódio, zinco, vitaminas lipossolúveis e má-digestão (SOLAYMANI-MOHAMMADI e SINGER, 2011).

De acordo com Troeger e colaboradores (2007) pacientes com giardíase crônica são caracterizados por apresentam redução na área da superfície duodenal e este processo, assim como a deficiência de dissacaridases microvilares são mediados por linfócitos CD8+ ativados, corroborando com a hipótese de que a imunopatologia mediada pela *Giardia* ocorre secundariamente ao rompimento da barreira intestinal, aliados ou não à presença de toxinas vindas do parasito (SCOTT; YU; BURET, 2004).

## 2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico para detecção do protozoário *G. intestinalis* é realizado através da observação no microscópio de cistos e trofozoítos nas fezes, sendo

preferencialmente procurado os cistos. Pode-se usar técnicas de coloração para facilitar a observação (KOEHLER et al., 2014). Testes mais recentes incluem microscopia de fluorescência, imuno-cromatografia e ensaios ELISA (imunofluorescência direta e indireta). Para o diagnóstico pode ainda fazer-se a pesquisa de anticorpos, mas esta apresenta baixa sensibilidade e baixa especificidade (PANIKER, 2013). A técnica de PCR tem sido usada para identificar os diferentes genótipos de *Giardia* (FENG e XIAO, 2011).

## 2.8 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O início do tratamento para giardíase foi estabelecido na década de 1940 com a introdução do fármaco quinacrina. Pouco tempo depois, sua eficácia contra o parasita *G. intestinalis* era superior a 90%; porém, com o aparecimento de linhagens resistentes, bem como o desenvolvimento de fármacos com um perfil de segurança superiores, sua produção foi interrompida nos EUA no início da década de 1990. Acredita-se que a quinacrina atue intercalando-se ao DNA (com preferência por regiões ricas em adenina ligadas a timina) inibindo assim a biossíntese de RNA e de proteínas em procariontes. A toxicidade relativa da quinacrina sobre *G. intestinalis* se deve à maior velocidade de absorção do fármaco pelo parasita do que por células humanas, sendo que os casos de resistência se devem exatamente a uma redução na captação do fármaco pelo protozoário (GARDNER e HILL, 2001; MÜLLER et al., 2007).

A segunda classe de compostos a serem utilizados para o tratamento da giardíase, os nitroimidazóis, foi descoberta em 1955 e inclui fármacos como o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol. Desde sua descoberta, metronidazol e demais nitroimidazóis são a principal ferramenta terapêutica no tratamento de infecções causadas por *G. intestinalis*. O modo de ação do metronidazol (um pró-fármaco) é reduzido a um radical nitro por elétrons provenientes da enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR), enzima que não está presente em células de eucariotos superiores. Este metronidazol reduzido atuaria como um aceptor terminal de elétrons e se ligaria covalentemente ao DNA, causando a perda da estrutura helicoidal, ruptura das hélices e subsequente morte do trofozoíto. A resistência aos

nitroimidazóis correlaciona com a diminuição da atividade da PFOR, necessária para sua bioativação redutiva (GARDNER e HILL, 2001; MÜLLER et al., 2007).

Outros fármacos utilizados para o tratamento da giardíase incluem nitazoxanida, furazolidona, benzimidazóis, paromomicina e bacitracina de zinco. A furazolidona é um dos representantes da classe dos nitrofuranos, compostos classicamente empregados como antibióticos e antimicrobianos. Como o metronidazol, o fármaco também sofre ativação redutiva no trofozoíto, porém esta redução ocorre através de uma NADH oxidase e não da PFOR. O resultado desta bioativação também resulta em danos ao DNA e os casos de resistência estão relacionados com a diminuição da entrada do fármaco no trofozoíto ou ao aumento dos níveis de cisteína oxidases/redutases, que são capazes de proteger o parasita contra os efeitos causados pelos radicais tóxicos (GARDNER e HILL, 2001). Já a nitazoxanida, um nitrotiazól eficaz no tratamento de uma gama de infecções parasitárias, incluindo a giardíase, atua de modo semelhante ao metronidazol sendo bioativada via PFOR, embora outros alvos, como as nitroredutases (GINR2), também tenham sido apontados para este fármaco (MÜLLER; SCHILDKNECHT; MÜLLER, 2013).

Os benzimidazóis, albendazol e mebendazol, exercem seu efeito tóxico através de interação com a  $\beta$ -tubulina do parasita, inibindo a polimerização do seu citoesqueleto. Resistência aos benzimidazóis ocorre em função de mudanças no citoesqueleto do parasita. Já a paromomicina, um aminoglicosídeo, inibe a síntese proteica de *G. intestinalis* através da ligação às subunidades 50S e 30S ribossomais, levando à leitura incorreta dos códons de RNA mensageiro. Entretanto, a suscetibilidade do parasita à paromomicina é menor do que aos nitroimidazóis, quinacrina ou furazolidona. Outro antibiótico, a bacitracina, representa uma alternativa para o tratamento de giardíase pois impede a desfosforilação de um fosfolípido necessário para a síntese da membrana celular. Contudo, o uso prolongado por via oral deste antibiótico está associado a casos de nefrotoxicidade e distúrbios gastrintestinais (GARDNER E HILL, 2001).

Um problema comum a praticamente todos os medicamentos empregados para o tratamento da giardíase está relacionado ao surgimento de linhagens

resistentes. Populações de *Giardia* parecem ter mecanismos muito flexíveis para responder às alterações do meio ambiente, tais como a pressão seletiva imposta por fármacos. A ocorrência de mutações no genoma desse parasita e a seleção de fenótipos diferentes, resulta em subpopulações com diferentes padrões de expressão gênica, possibilitando que o protozoário evada a resposta imune do hospedeiro. Tendo isso em vista, considera-se a variação antigênica como o principal mecanismo relacionado à resistência aos tratamentos.

Os mecanismos relacionados à resistência variam de fármaco para fármaco, mas em geral estão associados a mutações no alvo terapêutico ou à redução da captação dos fármacos pelos trofozoítos que, em ambos os casos, podem conduzir à falha terapêutica. Pacientes que são refratários à monoterapia podem ser tratados apenas pela associação de dois ou mais fármacos, como a combinação de metronidazol com quinacrina (MÜLLER et al., 2007; NASH et al., 2001).

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

Nabarro et al. (2015) descreveu o crescimento no número de casos refratários de giardíase após tratamento com 5-nitroimidazóis em um Hospital de Medicina Tropical de Londres, em pacientes que retornavam de viagens ao exterior, principalmente da Índia; o estudo conduzido entre o período de 2008-2013 demonstrou um aumento significativo de persistência parasitária após tratamento. Os autores observaram que, durante o ano de 2008, o número de casos de falha terapêutica com o uso de 5-nitroimidazóis foi de 15,1%. Esse número aumentou para 20,6% em 2011 e 40,2% em 2013 (NABARRO et al., 2015).

Além disso, alguns estudos isolaram parasitos menos susceptíveis em amostras clínicas de fezes oriundas de pacientes com giardíase. Farbey et al. (1995) encontraram uma exorbitante variação na susceptibilidade ao metronidazol em isolados clínicos analisados; a IC<sub>50</sub>, concentração do fármaco necessária para

inibir 50% do crescimento, variou de 0,0094  $\mu\text{M}$  até 154  $\mu\text{M}$ , uma diferença maior do que 16.000 vezes entre os isolados de maior e menor susceptibilidade.

Lemee et al. (2000) conseguiram associar a falha terapêutica de pacientes ao metronidazol a valores de  $\text{IC}_{50}$  maiores *in vitro* em comparação ao de pacientes que obtiveram cura clínica com o uso do mesmo fármaco.

Cepas resistentes ao metronidazol foram induzidas por vários autores. A indução da resistência aos medicamentos é realizada por meio da subcultura de parasitas sob concentrações subletais crescentes da droga. Após cada aumento na concentração do fármaco, os trofozoítos são subcultivados na presença dessa concentração do fármaco até se adaptarem (MÜLLER; STERK; HEMPHILL; MÜLLER, 2007). As enzimas que atuam na ativação do metronidazol são investigadas como prováveis causas da resistência das cepas induzidas *in vitro*, já que alterações no nível de expressão gênica ou atividade enzimática/capacidade de promover oxidorredução da piruvato-ferredoxina oxidoredutase, ferredoxina e nitrorredutase foram relatadas (BOREHAM; PHILLIPS; SHEPHERD, 1988; TOWNSON et al., 1992, ARGÜELLO-GARCÍA et al., 2009). No entanto, outras proteínas que não estão diretamente ligadas à ativação do metronidazol, como a glutamato desidrogenase (GDH), têm apresentado alterações em sua expressão gênica em cepas resistentes (MÜLLER et al., 2007; ANSELL et al., 2015). O comportamento das cepas resistentes ao metronidazol não é completamente caracterizado, sugerindo que múltiplos fatores podem levar à resistência de *G. intestinalis* ao metronidazol, como alterações genômicas, na expressão gênica, na abundância proteica, na atividade enzimática, na concentração de metabólitos e até mesmo a presença de bombas de efluxo no parasito. Todas essas mudanças podem acarretar alterações na susceptibilidade de *G. intestinalis* aos fármacos utilizados na prática clínica (ANSELL et al., 2015).

## 2.9 POLISSACARÍDEOS: NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

Apesar da ampla utilização desses fármacos, nitroimidazóis e benzimidazóis, quinacrina, furazolidona, paromomicina e nitazoxanida para o tratamento da giardíase, esses agentes estão frequentemente associados a efeitos colaterais

adversos e falhas terapêuticas. Neste contexto, a busca por novas estratégias capazes de conter infecções causadas por *G. intestinalis* vêm despertando interesse.

Uma alternativa de tratamento para aumentar a eficiência e diminuir a toxicidade é a busca por produtos naturais, polímeros ou macromoléculas como polissacarídeos que poderiam ter efeitos sinérgicos no tratamento da parasitose.

Polissacarídeos são polímeros de alto peso molecular, consistindo em pelo menos dez monossacarídeos mutuamente unidos por ligações glicosídicas. São macromoléculas essenciais para a vida em que participam da adesão celular, da comunicação célula-célula e do sistema imunológico (DWEK, 1995).

As fontes e estruturas de polissacarídeos são muito diversas. Os polissacarídeos podem originar-se de plantas, fungos, algas, bactérias entre outros. A nível celular, os polissacarídeos representam os compostos de reserva no citoplasma, como amido, ou componentes estruturais da membrana ou parede celular dos organismos, por exemplo, celulose. As principais estruturas de polissacarídeos de produtos naturais são complexas e diversas. O isolamento, purificação e utilização de polissacarídeos variam de acordo com suas características estruturais. Os polissacarídeos frequentemente encontrados em compostos naturais são glucano, frutano, xilano, manana, galactano, galactomanana, pectina, entre outros (SHI, 2016).

Geralmente, os polissacarídeos apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais, os quais desempenham papéis importantes no sistema imunológico. A heparina é um polissacarídeo que é um medicamento anti-inflamatório de amplo espectro por meio de uma ampla gama de mecanismos anti-inflamatórios. Como um, foi relatado que os polissacarídeos de *Dendrobium candidum* podem promover a produção de citocinas *in vitro* e *in vivo* para regular as atividades imunológicas (LIN, CHANG, YANG, YU, & WONG, 2014; XIE, HAO et al., 2016). O extrato de polissacarídeos do pólen de *Pinus massoniana* como um adjuvante imunológico pode melhorar os efeitos de diferentes vacinas (F. GUO et al., 2014; Q. GUO et al., 2014; SHI et al., 2013; WEI et al., 2011). Os polissacarídeos capsulares apresentam boa imunogenicidade e são amplamente utilizados no

desenvolvimento de vacinas polissacarídicas. Os polissacarídeos capsulares bacterianos surgem clinicamente na forma de vacinas, a prevenção da pneumonia e da meningite epidêmica é muito significativa. Atualmente em aplicação clínica da principal prevenção da encefalite meningocócica AC tipo vacina polissacarídica e vacina ACYW135, *Streptococcus pneumoniae* vacina polissacarídica, *Haemophilus influenzae* Hib vacina polissacarídica (SHI et al., 2014). O estudo descobriu que a vacina pneumocócica polissacarídica capsular pode reduzir o risco de pneumonia em idosos (LÉOPHONTE & NEUKIRCH, 2001; WIEMKEN et al., 2014).

Recentemente, os polissacarídeos extraídos de plantas medicinais têm despertado a atenção de diversos grupos devido às suas significativas bioatividades farmacológicas, como atividade antitumoral, atividade antioxidante, atividade anticoagulante, atividade antidiabética, atividade antiviral, imunomoduladora que os tornam adequados para aplicações medicinais (CHO et al., 2015; LI et al., 2012; LI et al., 2012; SHI, 2016). Estudos anteriores também mostraram que os polissacarídeos de plantas medicinais não são tóxicos e não apresentam efeitos colaterais.

O estudo realizado por Laurienzo (2010) descreveu polissacarídeos derivados de algas marinhas, tais como alginato, fucoidan que são distribuídos em diversas aplicações biomédicas e biológicas. Em outro estudo publicado por Vamanu (2012) foi descrito a atividade de polissacarídeos fúngicos extraídos de cogumelos com efeitos imunomoduladores, anticâncer, antimicrobiano, entre outros. Bem como, os efeitos gastroprotetores dos polissacarídeos (OLIVEIRA et al., 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos polissacarídeos na interação *in vitro* entre os trofozoítos de *Giardia intestinalis* e drogas antiparasitárias.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o IC<sub>50</sub> das drogas antiparasitárias sobre os trofozoítos de *G. intestinalis*.
2. Caracterizar o efeito dos polissacarídeos sobre os trofozoítos de *G. intestinalis* e células Caco-2.
3. Avaliar o sinergismo/combinção dos polissacarídeos e drogas antiparasitárias.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE *G. intestinalis*

O isolado WB de *G. intestinalis* foi cultivado em meio TYIS-33 (Keister, 1983) suplementado com 10% de soro bovino adulto (SAB) com 1% de Penicilina/ Estreptomicina 1000 U a 37°C em condições microaerofílicas. As culturas foram mantidas em tubos de poliestireno (13 mL) até a confluência ( $1 \times 10^6$  células/mL) e depois subcultivadas, a cada 72 h.

### 4.2 CULTURA DE CÉLULAS CACO-2

Células Caco-2 (adenocarcinoma de colón) foram cultivadas a 37°C, 5 % de CO<sup>2</sup> em meio RPMI (suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10 % e 100 U/ml de penicilina/estreptomicina) até atingir 100 % de confluência. Em seguida, as células foram tripsinizadas e semeadas em uma concentração de  $5 \times 10^5$ /ml em uma placa de 24 poços para experimento posterior.

### 4.3 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos utilizados nesse estudo foram gentilmente doados pela professora Dra. Lucimara Cordeiro Cortes, do departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná. Foram testados os polissacarídeos extraídos da camomila (MRW), AX-TUCUM (FTS-BF) e maracujá (FMS-HG).

Os polissacarídeos do chá de camomila foram extraídos e caracterizados quimicamente por Chaves et al., (2019). Resumidamente, o chá de camomila foi preparado a partir dos capítulos florais por infusão, filtrado, concentrado sob pressão reduzida e os polissacarídeos precipitados com etanol a 95% (3 vol.). Os polissacarídeos foram recuperados por filtração, dialisados em membrana semipermeável (Cellulose Spectrumlabs 6–8 kDa cut-off) e liofilizados, dando a fração MRW. Era composto por uma mistura de inulina tipo frutana, homogalacturonana altamente metil esterificada e acetilada (DE = 87% e DA = 19%), arabinogalactana tipo II e pequenas quantidades de um xilano ácido (Chaves et al., 2019).

#### 4.4 ENSAIO DE ADESÃO DOS POLISSACARÍDEOS EM CÉLULAS CACO-2

Células Caco-2 em fase logarítmica de crescimento foram tripsinizadas e semeadas em uma concentração de  $1 \times 10^5$  em uma placa de poliestireno de 24 poços (volume do poço 3,29 ml, diâmetro de 15,4 mm e área de crescimento de  $1,91 \text{ cm}^2$ ) e incubadas por 48 horas à  $37^\circ\text{C}$ , até 100 % de confluência. Adicionamos sobre células Caco-2 respectivas concentrações de polissacarídeo 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$  dissolvidos em RPMI e incubamos por 1h à  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram adicionados  $5 \times 10^5$  trofozoítos de *G. intestinalis* por poço, obtidos a partir de uma cultura de fase estacionária e incubado por 1h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente as 2h de experimento, a adesão foi estimada através da contagem dos parasitas em câmara de Neubauer dos não aderidos presentes no sobrenadante subtraído do número total de parasitas inoculados.

#### 4.5 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS

$5 \times 10^4$  trofozoítos/ml (cultivados em condições axênicas) foram adicionados em tubos de 5 ml contendo meio TYI-S-33, suplementado com soro adulto bovino (SAB) e antibiótico, na presença de concentrações crescentes de nitazoxanida e/ou albendazol para determinar a concentração inibitória 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) de cada uma das drogas. As culturas foram incubadas por 72h a  $37^\circ\text{C}$ . As culturas foram incubadas por 72h a  $37^\circ\text{C}$ . Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e acompanhados a cada 24 horas. Para o cálculo da  $\text{IC}_{50}$  foi extrapolado através da curva de inibição de crescimento através do programa GraphPad Prism 6.0.

#### 4.6 ENSAIO DE SINERGISMO ENTRE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS E POLISSACARÍDEO MRW

$5 \times 10^5$  trofozoítos (cultivados em condições axênicas) foram adicionados em tubos de 5 ml contendo meio TYI-S-33, suplementado com SAB e antibiótico. Os trofozoítos foram mantidos na presença de 250 ou 500  $\mu\text{g/ml}$  de polissacarídeo MRW e ABZ e/ou NTZ. As culturas foram incubadas por 72 horas a  $37^\circ\text{C}$ , e acompanhados a cada 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas,

com o meio e *Giardia* como controle positivo e o albendazol ou nitazoxanida como referência.

#### 4.7 ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DOS TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis*

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (500 µl de cada condição) do ensaio descrito acima (após 72h) foram ressuspensos em novo meio de cultura TYI-S-33, suplementado com SAB e antibiótico em tubos de 5mL. E reiniciada uma curva de crescimento, incubando os tubos a 37°C. O ensaio foi acompanhado durante 72 horas e quantificado a cada 24h utilizando um hemocitômetro.

#### 4.8 VIABILIDADE CELULAR

Células Caco-2 foram semeadas em placas de 24 poços a densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a 250, 500 e 1000 µg de polissacarídeo MRW durante 24 horas. Após o tempo exposição aos polissacarídeos, as células foram lavadas 2 vezes com RPMI e tripsinizadas. Em microtubos, alíquotas de 20 µL de suspensão celular de cada tratamento foram homogeneizadas com 20 µL de corante azul de tripano. Dessa mistura, 10 µL foram tomados e depositados em uma câmara de Neubauer e contadas no microscópio, as análises foram realizada em triplicata. A porcentagem de células viáveis (não coradas) e não-viáveis (coradas em azul) foi calculada de acordo com a Equação: Células viáveis = (Total de células viáveis/Total de células contadas) \* 100.

#### 4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão. Para comparação dos valores das médias dos grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para Múltiplas Comparações. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (versão 6.0).

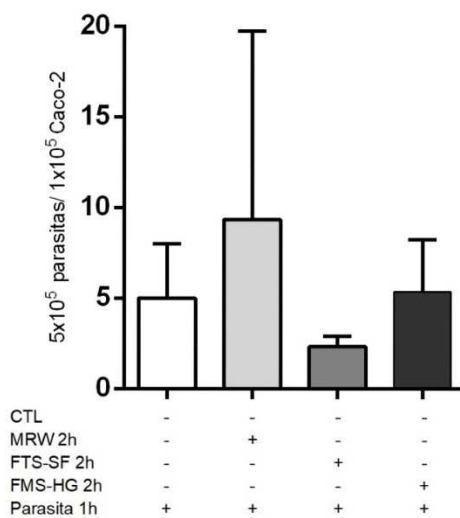
## 5 RESULTADOS

Sendo o objetivo central da dissertação avaliar o efeito sinérgico dos polissacarídeos combinados com drogas antiparasitárias, testamos uma série de polissacarídeos doados pela professora Dra. Lucimara Cortes Cordeiro, do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.

### 5.1 SCREENING DE POLISSICARÍDEOS

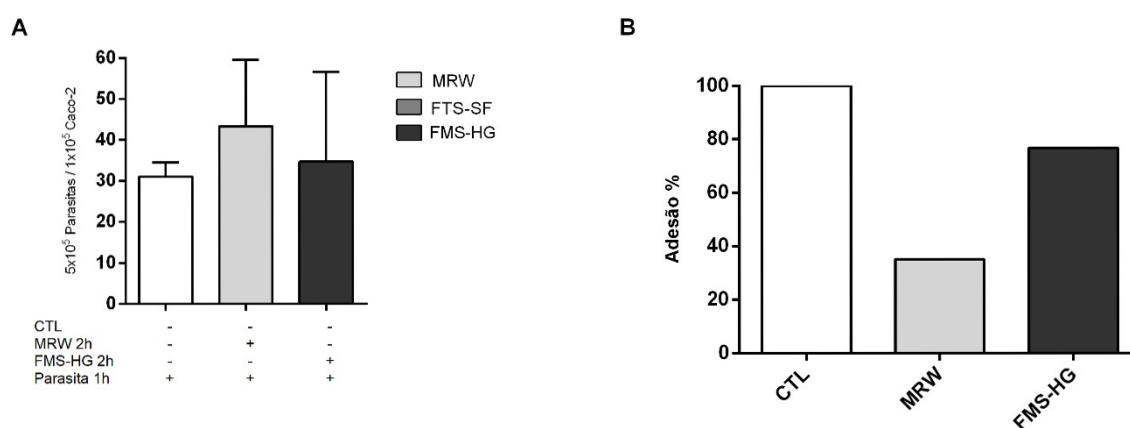
A triagem para a seleção do polissacarídeo com potencial antiparasitário foi realizada utilizando testes *in vitro*. Foram testados 3 polissacarídeos, extraídos da camomila (MRW), AX-TUCUM (FTS-BF) e maracujá (FMS-HG) e avaliados em sua capacidade de alterar o processo de adesão de *G. intestinalis* em células intestinais Caco-2 (FIGURA 4). Após 2 horas de incubação dos parasitas/células com os polissacarídeos, observamos que MRW e FMS-HG estavam alterando o processo de adesão, então escolhemos ambos como possíveis candidatos com potencial antiaderente (FIGURA 5).

FIGURA 4 – SELEÇÃO DO POLISSACARÍDEO COM POTENCIAL ANTIADERENTE. OS TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis* NA AUSÊNCIA (CTL) OU NA PRESENÇA DE 250 µg/ml CAMOMILA (MRW), AX-TUCUM (FTS-BF) E MARACUJÁ (FMS-HG) PREVIAMENTE TRATADOS POR 2 HORAS COM POLISSACARÍDEO E POSTERIORMENTE INCUBADOS COM TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis* DURANTE 1 HORA. A QUANTIFICAÇÃO FOI REALIZADA ATRAVÉS DA CONTAGEM DE PARASITAS NÃO ADERIDOS PRESENTES NO SOBRENADANTE, UTILIZANDO UM HEMOCITÔMETRO.



Para evidenciar melhor os efeitos, os resultados foram expressos em forma de diminuição da porcentagem de adesão (Figura 5 b). Devido ao maior efeito do polissacarídeo extraído da camomila (MRW) e por existir uma caracterização bioquímica previa dos compostos da camomila (CHAVES; IACOMINI; CORDEIRO, 2019), decidimos utilizá-lo para tratar células Caco-2.

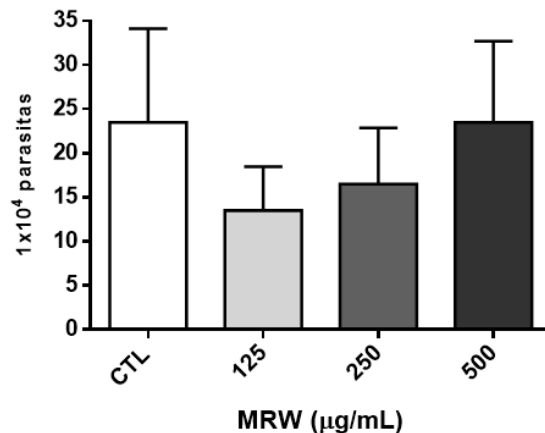
FIGURA 5 – EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE CÉLULAS CACO-2. A) ADESÃO DOS TROFOZOÍTOS EM CÉLULAS CACO-2 NA PRESENÇA DE POLISSACARÍDEOS MRW E FMS-HG. B) PORCENTAGEM DE ADESÃO DOS TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis* AS CÉLULAS CACO-2 NA AUSÊNCIA (CTL) OU NA PRESENÇA DE 250 µg/ml CAMOMILA (MRW), E MARACUJÁ (FMS-HG).



## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO POLISSACARÍDEO MRW

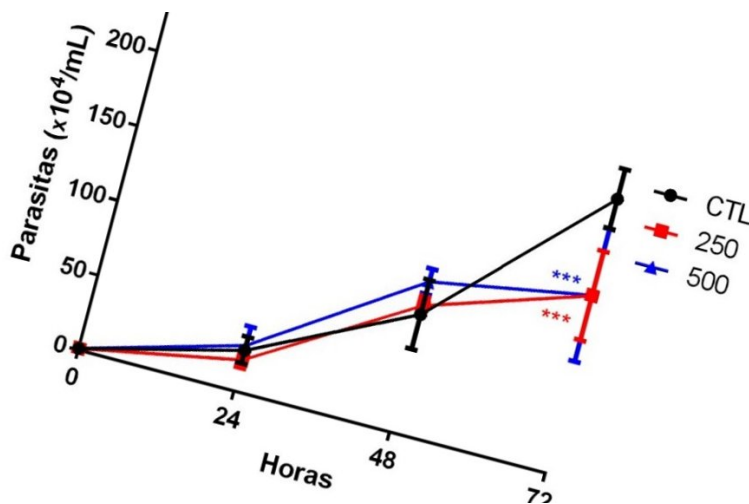
Com a finalidade de caracterizar os efeitos do polissacarídeo MRW sobre os parasitas e/ou células intestinais Caco-2, primeiramente, incubamos células Caco-2 com concentrações crescentes (125, 250 e 500 µg/ml) de polissacarídeo por 1 hora e em seguida incubamos com o parasita por 1h para observar a capacidade do polissacarídeo de alterar adesão nas células Caco-2. Na figura 6, observamos que as concentrações mais altas de polissacarídeo foram capazes de induzir maiores efeitos sobre a adesão dos parasitas, sugerindo um efeito de dose-dependência.

FIGURA 6 – QUANTIFICAÇÃO DOS TROFOZOÍTOS NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS CACO-2 APÓS INCUBAÇÃO COM POLISSACARÍDEO MRW. TOTAL DE PARASITAS NÃO ADERIDOS EM CÉLULAS CACO-2, INFECTADAS COM *G. intestinalis* NA AUSÊNCIA (CLT) E PÓS-TRATAMENTO DE 125, 250 E 500 µG/ML MRW.



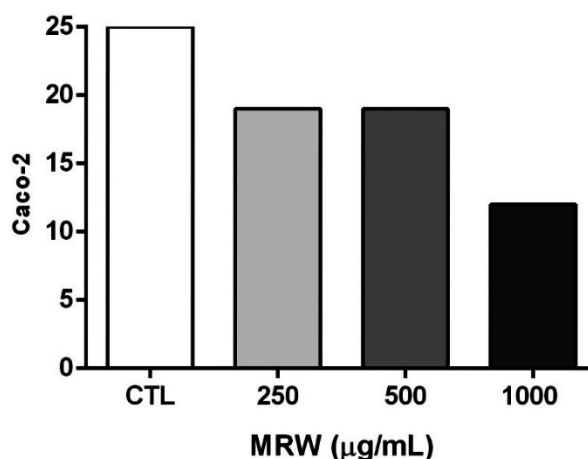
Posteriormente, decidimos avaliar se os polissacarídeos estariam alterando a proliferação dos parasitas, iniciando uma curva de crescimento dos parasitas na presença de diferentes concentrações do polissacarídeo MRW (FIGURA 7). Observamos que até as 48 horas não houve um efeito, em ambas as concentrações 250 e 500 µg/ml, entretanto, as 72 horas notamos uma diminuição e no número de parasitas com as duas concentrações de polissacarídeos testadas, comparadas ao número de parasitas do controle, o que indicaria uma citotoxicidade em longos tempos.

FIGURA 7 – CURVA DE CRESCIMENTO DE *Giardia*. O CRESCIMENTO DOS PARASITAS FOI AVALIADO APÓS SEREM INCUBADOS COM 250, 500 µg/ml DE POLISSACARÍDEO MRW. A QUANTIFICAÇÃO FOI REALIZADA POR CONTAGEM DIÁRIA DOS PARASITAS, POR MEIO DE UM HEMOCITÔMETRO. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM AVALIADOS ENTRE O CONTROLE E 250 E 500 µG/ML DE MRW.



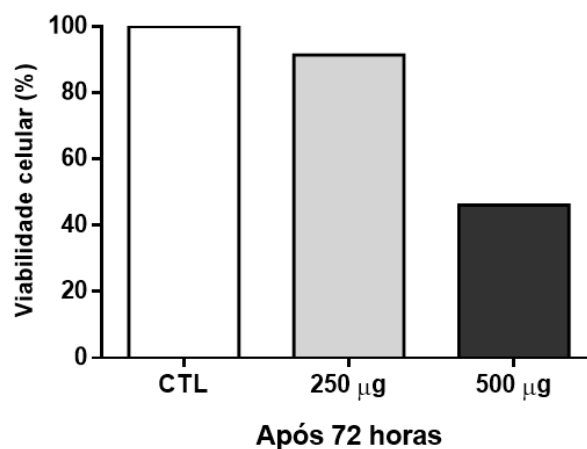
Decidimos avaliar se a replicação de células Caco-2 após serem tratadas com polissacarídeo também seria alterado. Testamos 3 concentrações de polissacarídeo MRW e avaliamos o efeito no crescimento celular, após 72 horas de tratamento. Observamos que quando as células foram incubadas com concentrações de 250 e 500  $\mu\text{g/ml}$  houve uma diminuição do crescimento em torno ao 20-25 %, alcançando mais de 50 % de inibição quando utilizada a maior concentração, 1000  $\mu\text{g/ml}$ , como mostrado na figura 8.

FIGURA 8 – CRESCIMENTO DE CÉLULAS CACO-2 *IN VITRO* APÓS TRATAMENTO COM POLISSACARÍDEO MRW. O CRESCIMENTO FOI AVALIADO NAS CONCENTRAÇÕES 250, 500 E 1000  $\mu\text{g/ml}$ .



Devido a alteração no crescimento dos parasitas e células Caco-2 incubados com diferentes concentrações do polissacarídeo MRW como observado anteriormente, avaliamos se havia perda de viabilidade celular em 2 concentrações pré-estabelecidas. Como nosso interesse era avaliar o efeito do polissacarídeo durante a interação parasita células intestinais, verificamos apenas a viabilidade das células, para poder encontrar uma concentração de polissacarídeo onde exista um efeito sobre a adesão dos parasitas as células sem causar toxicidade nas mesmas. A concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$  de MRW não alterou significativamente a viabilidade de células Caco-2, enquanto a concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$  mostrou-se alterar a viabilidade em aproximadamente 50% (FIGURA 9).

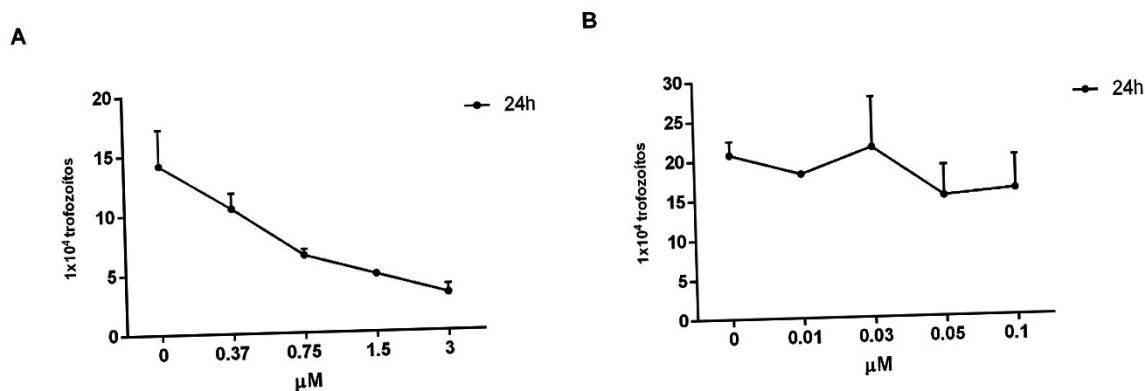
FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS CACO-2 TRATADAS POR 72H COM POLISSACARÍDEO MRW ATRAVÉS DE ENSAIO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPANO.



### 5.3 AVALIAÇÃO DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS INDIVIDUALMENTE

Inicialmente, para determinar a concentração inibitória 50 (IC<sub>50</sub>), ou seja, a concentração de droga que em contato com o parasito é capaz de inibir 50% do crescimento, nós avaliamos individualmente a eficácia de NTZ e ABZ contra *G. intestinalis* após 24h de exposição. Os resultados obtidos para NTZ mostraram inibir o crescimento dos parasitas em uma resposta dose-dependente, enquanto para o ABZ, o melhor desempenho foi observado nas concentrações de 0.1 e 0.05 µM (FIGURA 10).

FIGURA 10 - RESPOSTA INIBITÓRIA DE DROGAS ANTIPARASITÁRIAS EM TROFOZOÍTOS DE *G. intestinalis* IN VITRO. A) PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO A NITAZOXANIDA. B) PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DOS PARASITAS APÓS EXPOSIÇÃO AO ALBENDAZOL.





De acordo com os resultados obtidos acima, calculamos o IC<sub>50</sub> de NTZ e ABZ a partir dos dados da curva de inibição dos parasitas. A tabela 2 mostra o IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> após 24h de exposição.

TABELA 2 - SUSCEPTIBILIDADE DE *G. intestinalis* AO TRATAMENTO DE NITAZOXANIDA E ALBENDAZOL.

Agente antimicrobiano	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>90</sub> (µM)
NTZ	0.9	1.32
ABZ	0.08	0.72

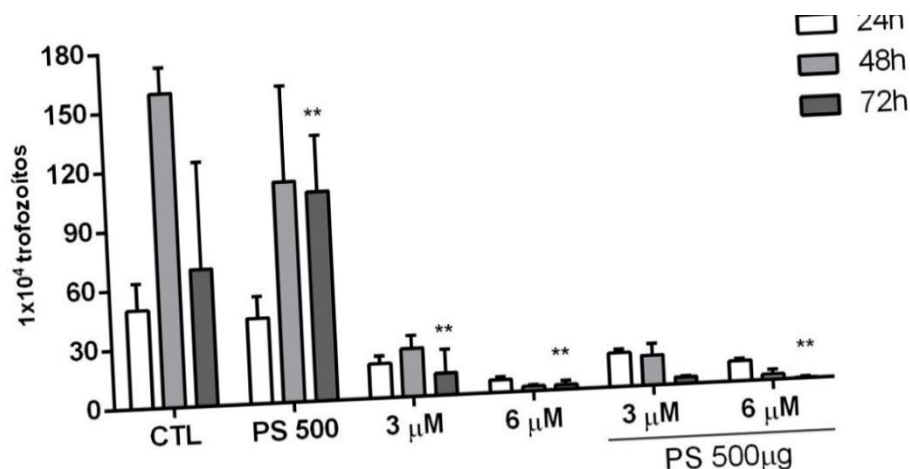
IC<sub>50</sub>, concentração inibitória de 50%; IC<sub>90</sub>, concentração inibitória de 90%.

#### 5.4 SINERGISMO ENTRE DROGAS ANTIPASITÁRIAS E POLISSACARÍDEO MRW

Com o indicativo de que a combinação de substâncias com efeito sinérgico e drogas anti-giardiais tem sido uma alternativa para aumentar eficiência e diminuir os efeitos colaterais das drogas, nós realizamos testes com NTZ e ABZ combinados com polissacarídeo MRW. Nossa proposta era encontrar a mínima concentração de droga que combinada com o polissacarídeo, fosse mais eficaz e menos tóxica ao organismo.

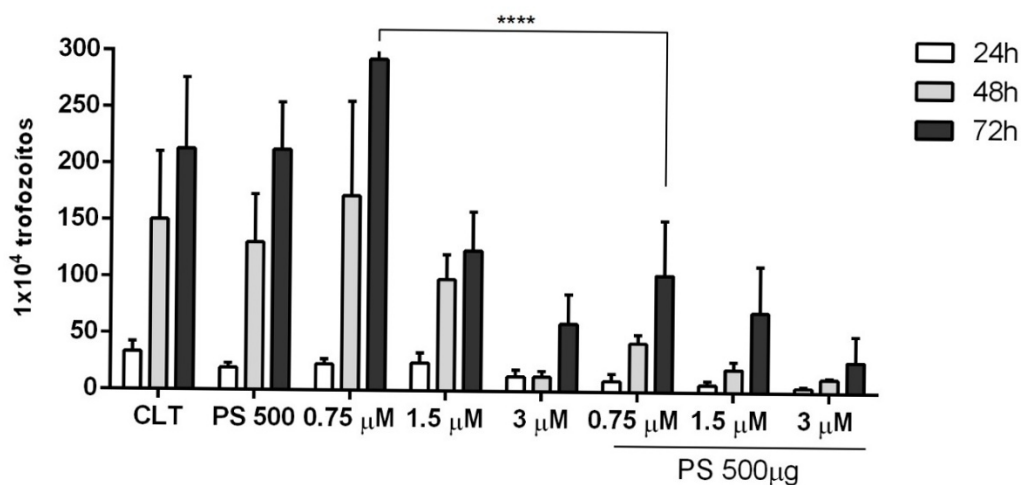
Inicialmente, testamos 2 concentrações de NTZ previamente descritas para *G. intestinalis*, 3 e 6 µM na presença de 500 µg de polissacarídeo MRW (FIGURA 11). Observou-se que ambas as concentrações eram muito efetivas, e não nos permitiu encontrar uma diferença no tratamento sinérgico.

FIGURA 11 – EFEITOS SINÉRGICOS *IN VITRO* ENTRE NITAZOXANIDA E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE *G. intestinalis* APÓS 72 HORAS. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM AVALIDOS ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE NITAZOXANIDA E COMBINAÇÃO COM MRW.



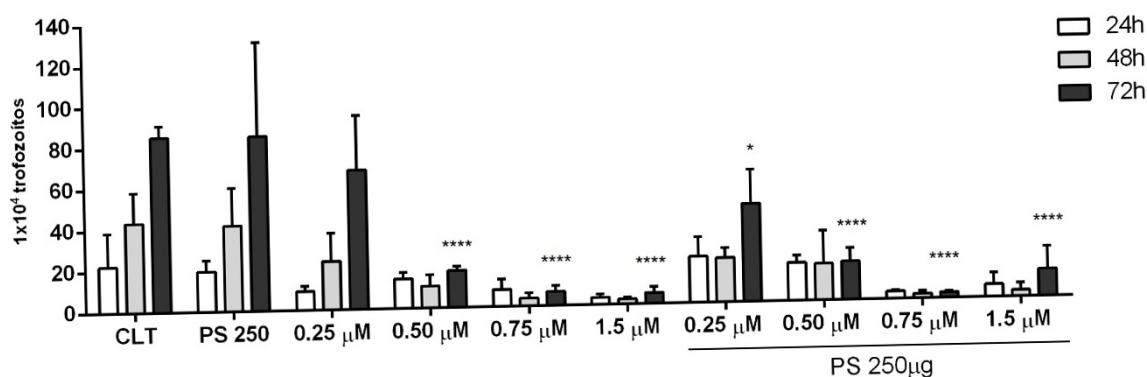
Em seguida, nós resolvemos testar concentrações menores da droga e avaliar o efeito sinérgico. Nossos resultados demonstraram que os parasitas tratados com 0.75 e 1.5  $\mu\text{M}$  de NTZ na presença de 500  $\mu\text{g}$  apresentaram diminuição no crescimento em aproximadamente 50% após 72h de tratamento. Existindo diferença significativa entre 0.75  $\mu\text{M}$  de NTZ individualmente e combinado com o polissacarídeo MRW, indicando um sinergismo entre os compostos (FIGURA 12). A concentração de 3  $\mu\text{M}$  foi descartada para os demais experimentos, porque apesar de inibir o crescimento dos parasitas, poderia ser tóxica ao organismo.

FIGURA 12 – EFEITOS SINÉRGICOS *IN VITRO* ENTRE NITAZOXANIDA E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE *G. intestinalis* APÓS 72 HORAS.



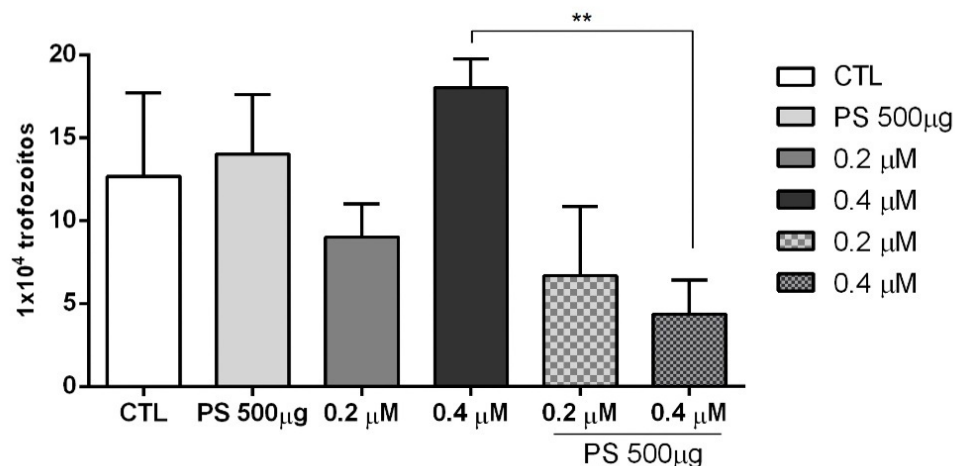
A partir dos resultados obtidos de viabilidade celular (FIGURA 9), nós decidimos realizar os próximos experimentos com concentração de 250 µg/ml de polissacarídeo. O ensaio representado na figura 13, revelou que quando foram utilizadas diferentes concentrações de NTZ incubados com 250 µg/ml do polissacarídeo MRW, a concentração de 0.25 µM indicou uma maior tendência ao efeito sinérgico em 72h.

FIGURA 13 – EFEITO SINÉRGICO *IN VITRO* ENTRE NITAZOXANIDA E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE *G. intestinalis* APÓS 72 HORAS. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM AVALIADOS ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE NITAZOXANIDA E COMBINAÇÃO COM MRW.



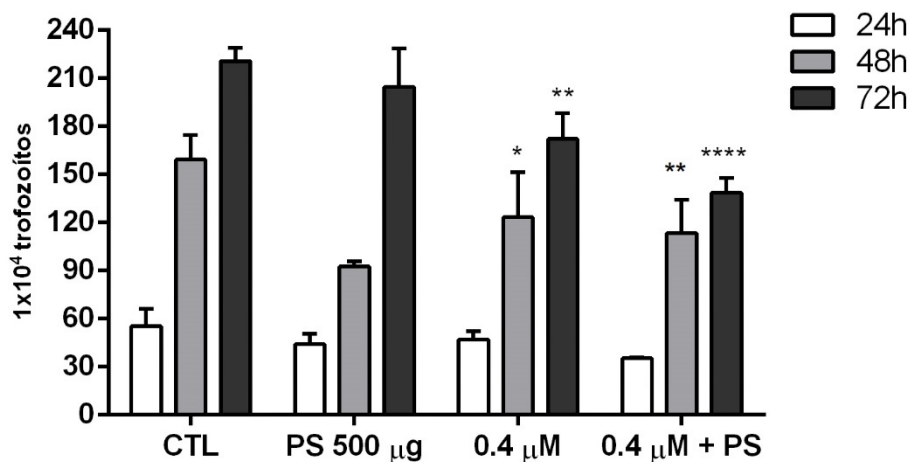
Sendo nossos resultados de sinergismo com NTZ promissores, seguimos avaliando-o, agora com ABZ. Para avaliar o efeito sinérgico do ABZ e polissacarídeo MRW, nós inicialmente testamos 2 concentrações da droga, 0.2 e 0.4 µM, combinadas com 500 µg/ml de polissacarídeo. O nosso primeiro experimento nessas condições demonstrou que não havia morte dos parasitas quando tratados somente com a droga (FIGURA 14). Entretanto, nós observamos que crescimento dos parasitas na combinação da droga e polissacarídeo, principalmente a concentração de 0.4 µM estava diminuindo, então resolvemos seguir avaliando o efeito com esta concentração nos próximos experimentos.

FIGURA 14 – RESPOSTA *IN VITRO* DA COMBINAÇÃO DE ALBENDAZOL E POLISSACARÍDEO MRW CONTRA *G. intestinalis* APÓS 72H DE TRATAMENTO.



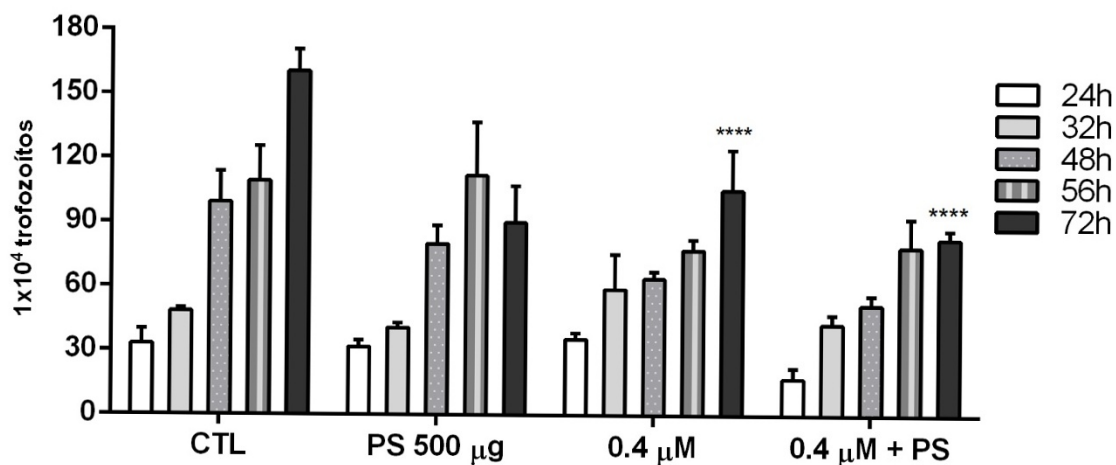
Repetimos o experimento com a concentração de 0.4 µM de ABZ e novamente observamos que nosso controle positivo, a droga sozinha, não estava causando a morte/diminuição dos parasitas (FIGURA 15).

FIGURA 15 - RESPOSTA *IN VITRO* DA COMBINAÇÃO DE ALBENDAZOL E POLISSACARÍDEO MRW CONTRA *G. intestinalis*. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM AVALIADOS ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE ALBENDAZOL E COMBINAÇÃO COM MRW.



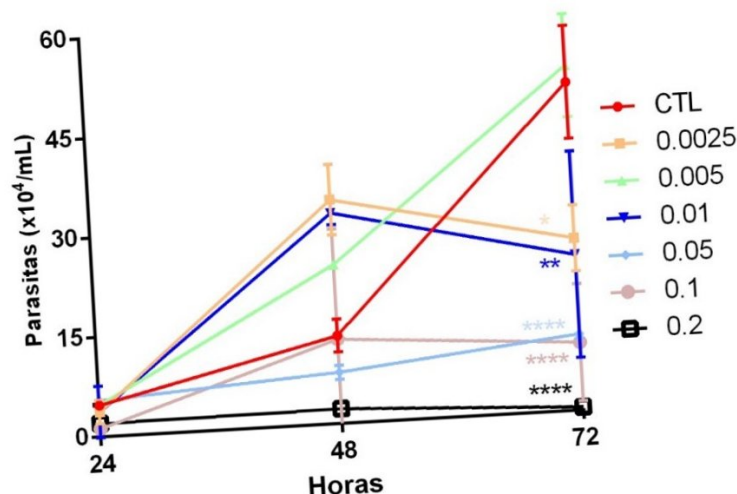
Nos questionamos se estaríamos perdendo algum evento durante o tratamento/exposição, por isso resolvemos contar os parasitas entre intervalos de tempo menores e avaliar se a droga estaria atuando nesse período (FIGURA 16). Entretanto, não observamos nenhuma diferença na inibição dos parasitas.

FIGURA 16 – RESPOSTA *IN VITRO* DA COMBINAÇÃO DE ALBENDAZOL E POLISSACARÍDEO MRW CONTRA *G. intestinalis*. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM AVALIADOS ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE ALBENDAZOL E COMBINAÇÃO COM MRW.



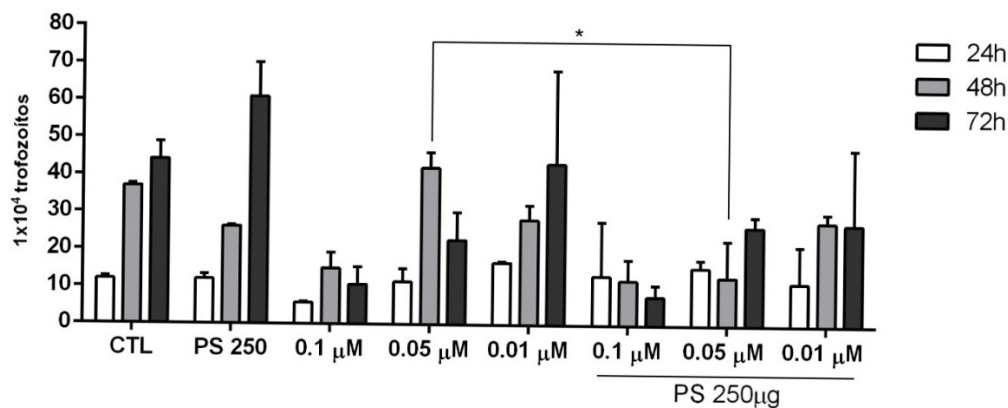
Seguimos repetindo o experimento, porém os resultados foram os mesmos (dados não mostrados). Após essa sequência de experimentos nós confirmamos que havia algum problema com a droga que estávamos utilizando, pois não havia redução no número de parasitas na presença da droga, a partir dos dias. E nós observamos um aumento, semelhante ao controle (CTL), sem droga, corroborando com a nossa hipótese. Portanto, resolvemos adquirir um novo ABZ e avaliar atividade da droga sobre o crescimento dos parasitas (FIGURA 17). Nossos resultados demonstraram que a nova droga estava sendo efetiva, principalmente quando utilizávamos as maiores concentrações de ABZ e a inibição no crescimento era dose-dependente.

FIGURA 17 – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA DROGA ALBENDAZOL SOBRE *G. intestinalis* DURANTE 72H DE EXPOSIÇÃO. A COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI AVALIADA ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE ALBENDAZOL.



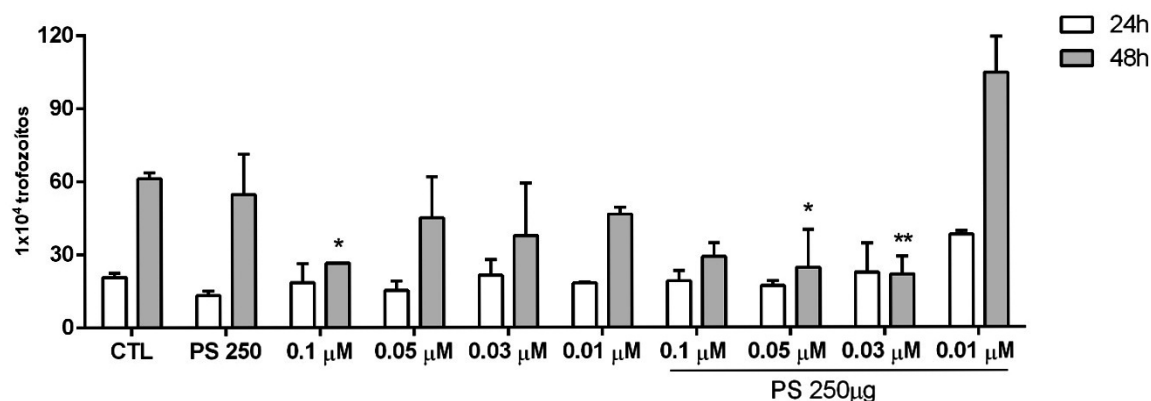
Após confirmar a eficiência da droga, nós definimos 3 concentrações previamente testadas para a nossa população de parasitas. Avaliamos inicialmente as concentrações de 0.1, 0.05, 0.01 μM de ABZ. Observamos nesses resultados que 0.1 μM inibia o crescimento dos parasitas, mas não apresentava um sinergismo. Entretanto, o tratamento de 0.05 μM, significativamente estatístico, e 0.01 μM na presença do polissacarídeo MRW alterava o crescimento dos parasitas (FIGURA 18).

FIGURA 18 – EFEITO SINÉRGICO *IN VITRO* ENTRE ALBENDAZOL E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE *G. intestinalis* APÓS 72 HORAS.



Esses dados nos levaram a testar mais uma concentração de droga 0.03 μM, que pudesse demonstrar o efeito sinérgico do tratamento. Os dados mostraram que em 48 horas ocorre o sinergismo entre albendazol e polissacarídeo nas concentrações de inferiores a 0.1 μM (FIGURA 19).

FIGURA 19 - EFEITO SINÉRGICO *IN VITRO* ENTRE ALBENDAZOL E O POLISSACARÍDEO MRW NA INIBIÇÃO DE *G. intestinalis* APÓS 72 HORAS. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE ALBENDAZOL E COMBINAÇÃO COM MRW.



A partir dos resultados obtidos do sinergismo entre NTZ e ABZ, nós representamos em porcentagem a inibição do crescimento dos parasitas que foram tratados individualmente com ABZ ou NTZ e combinados com polissacarídeo MRW. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 3.

TABELA 3 - SUSCEPTIBILIDADE DE *G. intestinalis* AO TRATAMENTO DE ALBENDAZOL E NITAZOXANIDA, INDIVIDUALMENTE E EM COMBINAÇÃO COM POLISSACARÍDEO MRW.

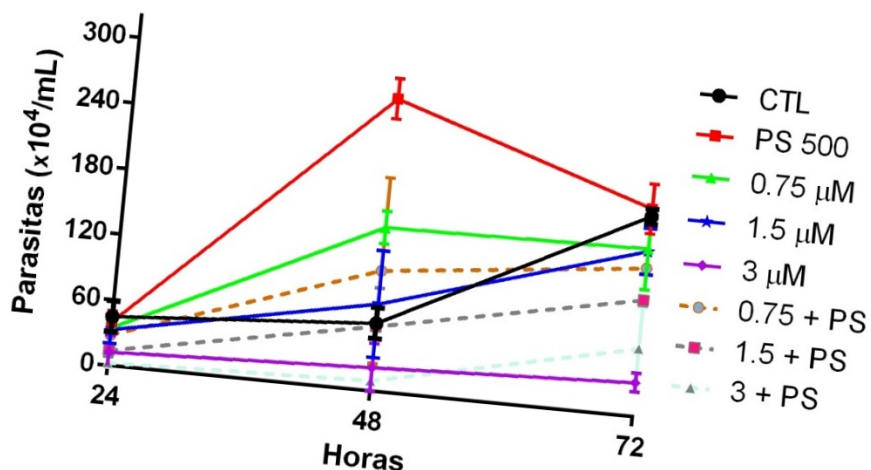
Tratamento		Viabilidade Parasita
(μM/mL)	NTZ (%)	NTZ + MRW (%)
0.25	79,84	55,96
0.50	21,13	21,95
0.75	137,50	48,43
1.5	58,28	33,12
3	28,12	12,81
(μM/mL)	ABZ (%)	ABZ + MRW (%)
0.1	43,26	47,34
0.05	73,46	40
0.03	61,63	35,61
0.01	75,91	170,61

## 5.5 RECUPERAÇÃO DE CULTURA DOS PARASITAS

Nos interessava saber se depois de tratados com drogas antiparasitárias e polissacarídeo, os parasitas eram capazes de se recuperar e reiniciar uma nova curva de crescimento. Para isso, após 72 horas de tratamento sinérgico, os parasitas foram ressuspensos em meio de cultura novo e acompanhados durante 72 horas.

Iniciamos o ensaio de reestabelecimento de cultura utilizando os trofozoítos de *G. intestinalis* conforme as condições do tratamento descrito na figura 12. Nossos resultados demonstraram que nessas condições, a maioria dos trofozoítos se recuperavam (FIGURA 20).

FIGURA 20 – ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE *G. intestinalis* EXPOSTA AO POLISSACARÍDEO MRW E NITAZOXANIDA.

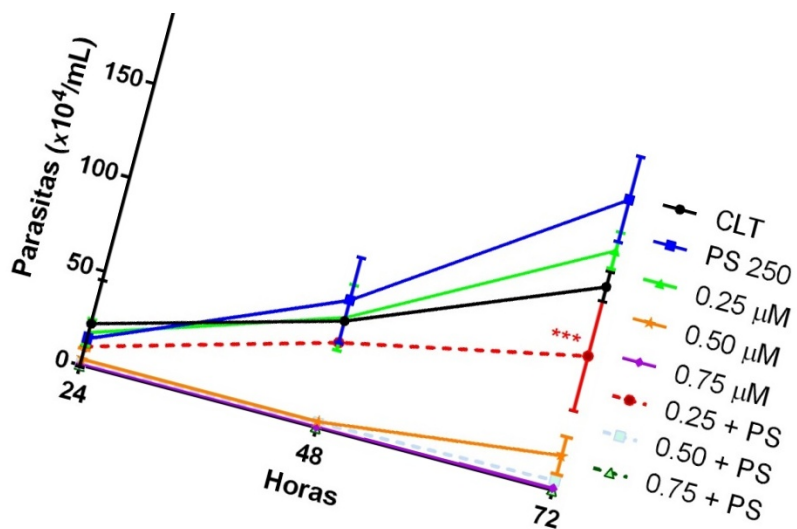


Como nosso interesse era avaliar se concentrações menores de droga também seriam menos tóxicas, reiniciamos uma cultura após tratamento dos trofozoítos conforme condições da figura 13. Observamos que 0.50 e 0.75 μM após tratamento sinérgico perderam a capacidade de estabelecer cultura, contribuindo para nossa ideia de utilizar concentrações menos tóxicas ao organismo (FIGURA 21). Esses resultados indicam que mesmo que o sinergismo de polissacarídeos e antiparasitários não seja capaz de inibir completamente os parasitas, ele reduz a capacidade do parasita estabelecer uma nova curva de crescimento, portanto,



poderia ser utilizado como uma nova estratégia de tratamento da giardíase, juntamente com drogas antiparasitárias.

FIGURA 21 - ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE *G. intestinalis* EXPOSTA AO POLISSACARÍDEO MRW E NITAZOXANIDA. OS VALORES DE COMPARAÇÃO DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FORAM ENTRE O CONTROLE E AMBAS CONCENTRAÇÕES DE NITAZOXANIDA E COMBINAÇÃO COM MRW.



## 6 DISCUSSÃO

A giardíase é uma das doenças diarreicas parasitárias mais comuns no mundo todo, afetando milhares de pessoas. A doença é comumente tratada com metronidazol. Entretanto, efeitos adversos e falhas terapêuticas foram observadas em todos os agentes anti-giardíacos como: metronidazol, quinacrina, furazolidona e albendazol, provavelmente devido a dose inadequada ou baixa adesão ao tratamento, imunossupressão, reinfecção ou resistência ao medicamento (LALLE e HANEVIK, 2018). A toxicidade de medicamentos refratários ao tratamento e a ocorrência de *G. intestinalis* resistente ao metronidazol têm motivado a busca por outros medicamentos como alternativa. O albendazol e a nitazoxanida surgiram como alternativa, assim como a combinação de tratamentos com drogas e outros componentes para diminuir a toxicidade e aumentar a eficiência (ARGÜELLO-GARCÍA et al., 2020). Diante do exposto, alternativas terapêuticas tornam-se muito atrativas, como a busca por produtos naturais, polímeros ou macromoléculas como polissacarídeos que poderiam ter efeitos sinérgicos no tratamento da giardíase.

Conduzimos nosso estudo usando polissacarídeos extraídos do chá de camomila. A *Matricaria camomila* pertence a um importante grupo de plantas medicinais cultivadas, muitas vezes referida como a “estrela entre as espécies medicinais”. Mais de 120 constituintes químicos foram identificados na flor da camomila como metabólitos secundários, o que dá à camomila seus valores multiterapêuticos, cosméticos e nutricionais, que foram estabelecidos através de anos de uso e pesquisa tradicionais e científicos (SINGH et al., 2011). A presença de inulina, FOS, homogalacturonana altamente metil esterificada, arabinogalactana tipo II e xilana ácida no chá de camomila mostra que não apenas os metabólitos secundários podem ser as moléculas responsáveis pelos benefícios à saúde do consumo de camomila e adiciona à camomila uma nova propriedade, como fonte de fibras dietéticas estruturalmente diversas com funções prebióticas, gastrointestinais e imunológicas potenciais.

A viabilidade de cepas de *Giardia* em contato com a droga é avaliada *in vitro* por diversos parâmetros que medem a aptidão do parasita como, adesão ao vidro ou plástico ou à cultura de células intestinais, curva de crescimento (FARBET et al.,

1995) e parâmetros bioquímicos como atividades enzimáticas, consumo de oxigênio (CÉU SOUSA & POIARES-DA-SILVA, 1999; INGE & FARTHING, 1987; KANG et al., 1998; WRIGHT et al., 1992).

Neste trabalho, analisamos a susceptibilidade de *G. intestinalis* após exposição ao ABZ e NTZ e encontramos valores de IC<sub>50</sub> de 0.08 e 0.9 µM, respectivamente. Cedillo-Rivera et al. (1992) descreveram o IC<sub>50</sub> de ABZ sendo, 0.01 mg/L. Enquanto, Cruz et al. (2003) encontraram o valor de 0.113 µM, demonstrando que há uma diferença nos valores de IC<sub>50</sub>. Para NTZ foram encontrados os valores de 1.214 µM (NAVARRETE-VAZQUEZ et al., 2011; COLÍN-LOZANO et al., 2017), valor próximo ao encontrado em nosso estudo.

O estudo publicado por Velázquez-olvera et al. (2016), avaliou derivados sintéticos 2-aril-3-hidroximetilimidazo [1,2-a] piridinas 1 e pirimidinas 2 contra trofozoítos de *Giardia in vitro* em comparação com albendazol. Além disso, a ação sinérgica do albendazol em combinação com cada uma das 2-aril-3-hidroximetilimidazo [1,2-a] piridinas e pirimidinas também foi avaliada. Os resultados mostraram que os derivados sintéticos apresentaram eficácia em uma concentração semelhante à do albendazol, e em relação ao sinergismo, o IC<sub>50</sub> da combinação do albendazol com os compostos apresentaram uma melhor ação anti-giardial, mostrando maior eficácia do que o albendazol sozinho.

Em nossos ensaios, avaliamos o efeito do polissacarídeo MRW de camomila recentemente descrito, em combinação com as drogas antiparasitárias. Nós demonstramos que as concentrações de 0.75 e 1.5 µM de NTZ e 0.1, 0.05 e 0.03 µM de ABZ, combinadas com 250 µg de polissacarídeo MRW foram capaz de potencializar a atividade anti-giardia. Para o ABZ, as concentrações 0.05 e 0.03 µM foram mais eficientes em inibir parasitas, quando combinadas com polissacarídeo MRW, especialmente 0.05 µM que individualmente apresentava 73,46 % dos parasitas, combinado com polissacarídeo reduziu para 40%. O mesmo efeito foi observado para NTZ a partir de 0.75 µM, destacando esta concentração da droga (0.75 µM) que individualmente apresentava 137,50 % e quando combinado com polissacarídeo MRW reduziu para 48,43 %.

Devido a presença de resistência que pode tornar crônica as infecções um parâmetro importante é avaliar a capacidade do parasita se recuperar após serem incubados após a combinação de drogas e polissacarídeo. Nossos dados mostraram que concentrações de 250 µg/ml de polissacarídeo MRW combinados com 0.25 a 0.75 µM de NTZ impediram a recuperação dos parasitas, reforçando a utilização de concentração mais eficiente e menos tóxica no tratamento da giardíase. Possivelmente porque as concentrações mais altas da droga, como 1.5 e 3 µM estariam alterando metabolicamente as atividades do parasita, impedindo que ocorra um efeito do polissacarídeo MRW. No entanto, os mecanismos de ação contra *G. intestinalis* não foram identificados, porém é provável que o efeito sinérgico da ação antiparasitária ocorra como resultado da interação entre os compostos.

Produtos naturais obtidos de patógenos, plantas ou animais têm sido usados para buscar a atividade anti-giardial. Embora alguns compostos com efeitos anti-giardiais tenham sido identificados, os mecanismos de ação raramente foram relatados. Um exemplo disso é o galacto-glicerolípido isolado da azeda rasteira de ervas daninhas (*Oxalis corniculata*) que foi descrito com ação anti-giardial com descolamento do trofozoíto, citólise e dano à membrana (MANNA et al., 2010).

Os polissacarídeos isolados da medicina tradicional chinesa podem ativar ou regular os linfócitos T e macrófagos, aumentar a atividade da interleucina e melhorar o nível de anticorpos e regular a função imunológica do organismo (ZHAET al., 2015). O medicamento tradicional mexicano *Bursera fagaroides* tem sido utilizado como um agente anti-inflamatório, e antidiarreico, tem boa atividade contra a *Giardia*. Embora os dados sugiram que este composto interfere na dimerização da tubulina (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et al., 2017, 2019).

Os nossos resultados reforçam a importância da realização de outros ensaios para explorar uma possível aplicação clínica que permitiria o uso de uma dose menor de NTZ e/ou ABZ combinadas com polissacarídeos e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais indesejáveis.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados demonstraram que a combinação de polissacarídeo MRW com drogas antiparasitários inibiram potencialmente o crescimento dos parasitas, mostrando mais eficácia no tratamento do que as drogas sozinhas. Demostramos também que os polissacarídeos não alteraram a viabilidade de células epiteliais Caco-2. Além da incapacidade dos parasitas se recuperarem após ser incubados com drogas antiparasitárias e polissacarídeo.

Juntos nossos dados sugerem os polissacarídeos como alternativa de tratamento, onde a camomila possui outro aspecto importante dentro de suas propriedades tornando o tratamento para *G. intestinalis* menos tóxico e mais eficaz.

## 8 PERSPECTIVAS

Para melhor interpretar os eventos estudados durante esse trabalho, alguns experimentos poderão ser realizados:

- 1) Avaliar o tempo de recuperação dos parasitas após incubação com ABZ e polissacarideo MRW.
- 2) Avaliar o índice de seletividade da droga.
- 3) Realizar experimento de “cura”, pretendemos incubar os parasitas aderidos sobre células caco-2 com altas concentrações de NTZ e/ou ABZ e combinados com polissacarideo MRW e avaliar a morte dos parasitas após tratamento de 24h.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev** 3: 447-475, 2001.
- ANKARKLEV, J; JERLSTRÖM-HULTQVIST, J; RINGQVIST, E; TROELL, K; SVÄRD, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of giardia species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 413-422, 2010.
- ANSELL, B. R.E.; MCCONVILLE, M. J.; MA'AYEH, S. Y.; DAGLEY, M. J.; GASSER, R. B.; SVÄRD, S. G.; JEX, A. R. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 888-901, 2015.
- ARGÜELLO-GARCÍA, R; CRUZ-SOTO, M; ROMERO-MONTOYA, L; ORTEGA-PIERRES, G. In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1057-1064, 2009.
- ARGÜELLO-GARCÍA, R; LEITSCH, D; SKINNER-ADAMS, T; ORTEGA-PIERRES, M. G. Drug resistance in *Giardia*: mechanisms and alternative treatments for giardiasis. **Giardia And Giardiasis, Part B**, p. 201-282, 2020.
- BENCHIMOL, M. Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. **Biol. Cell**, 96: 291-301, 2004.
- BERKMAN, D. S; LESCANO, A. G; GILMAN, R. H; LOPEZ, S. L; BLACK, M. M. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **The Lancet**, v. 359, n. 9306, p. 564-571, 2002.
- BERNANDER, R; PALM, J. E. D; SVARD, S. G. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 55-62, 2001.
- BOREHAM, P. F. L.; PHILLIPS, R. E.; SHEPHERD, R. W. Heterogeneity in the responses of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 3, p. 406–407, 1987.
- BOREHAM, P.F.L.; PHILLIPS, R.E.; SHEPHERD, R.W. Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 104-106, 1988.
- BURET, A.; GALL, D. G.; OLSON, M. E. Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. **Parasitology Research**, v. 77, n. 2, p. 109-114, 1991.

BURET, A.G.; AMAT, C. B.; MANKO, A. *et al.* *Giardia duodenalis*: New Research Developments in Pathophysiology, Pathogenesis, and Virulence Factors. **Curr Trop Med Rep**, v. 2, p. 110–118, 2015.

CACCIÒ, S. M.; THOMPSON, R.C. A; MCLAUCHLIN, J.; SMITH, H. V. Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. **Trends In Parasitology**, v. 21, n. 9, p. 430-437, 2005.

CACCIÒ, S. M; RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Mol Biochem**, 2008.

CARRANZA, P. G.; LUJAN, H. D. New insights regarding the biology of Giardia lamblia. **Microbes And Infection**, v. 12, n. 1, p. 71-80, 2010.

CEDILLO-RIVERA, R.; MUNOZ, O. In-vitro susceptibility of Giardia lamblia to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 221-224, 1 set. 1992.

CERNIKOVA, L.; FASO, C.; HEHL, A. B. Five facts about Giardia lamblia. **Plos Pathogens**, v. 14, n. 9, 2018.

CÉU, SOUSA, M; POIARES-DA-SILVA, J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of Giardia lamblia trophozoites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 12, p. 2939–2942, 1999.

CHAVES, P. F. P.; IACOMINI, M; CORDEIRO, L. M.C. Chemical characterization of fructooligosaccharides, inulin and structurally diverse polysaccharides from chamomile tea. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 269-275, 2019.

CHIN, A. C.; TEOH, D. A.; SCOTT, Kevin G.E.; MEDDINGS, J. B.; MACNAUGHTON, W. K.; BURET, A. G. Strain-Dependent Induction of Enterocyte Apoptosis by Giardia lamblia Disrupts Epithelial Barrier Function in a Caspase-3-Dependent Manner. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3673-3680, 2002.

CHO, C. W., HAN, C. J.I; RHEE, Y. K.; LEE, Y. C.; SHIN, K. S.; SHIN, J. S.; LEE, K.T.; HONG, H. DO. Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 519–525, 2015.

COELHO, C.M.; DURIGAN, M.; LEAL, D. A. G.; SCHNEIDER, A. B.; FRANCO, R. M. B.; SINGER, S. M. Giardiasis as a neglected disease in Brazil: systematic review of 20 years of publications. **PLoS Negl Trop Dis**, 2017.

COLÍN-LOZANO, B.; LEÓN-RIVERA, I.; CHAN-BACAB, M. J.; ORTEGA-MORALES, B. O.; MOO-PUC, R.; LÓPEZ-GUERRERO, V.; HERNÁNDEZ-NÓÑEZ, E.; ARGÜELLO-GARCIA, R.; SCIOR, T.; BARBOSA-CABRERA, E. Synthesis, in vitro and in vivo giardicidal activity of nitrothiazole-NSAID chimeras displaying broad antiprotozoal spectrum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 15, p. 3490-3494, ago. 2017.



COTT, K. G.E.; MEDDINGS, J. B.; KIRK, D. R.; LEES-MILLER, S. P.; BURET, A. G. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1179-1190, 2002.

COTTON, J. A.; BEATTY, J. K.; BURET, A. G. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. **International Journal For Parasitology**, v. 41, n. 9, p. 925-933, 2011.

CRUZ, A.; SOUSA, M. I.; AZEREDO, Z.; SILVA, M. C.; SOUSA, J.C F.; MANSO, O.; CABRAL, M. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs in vitro. **Acta Tropica**, v. 88, n. 2, p. 131-135, 2003. DAWSON, S. C.; HOUSE, S. A. Imaging and Analysis of the Microtubule Cytoskeleton in *Giardia*. **Microtubules: in vivo**, p. 307-339, 2010.

DE CARVALHO, T. B.; DE CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (Sao Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *G. duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-273, 2006.

DIZDAR, V.; GILJA, O. H.; HAUSKEN, T. Increased visceral sensitivity in *Giardia*-induced postinfectious irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. Effect of the 5HT3-antagonist ondansetron. **Neurogastroenterology & Motility**, 2007.

DOBELL, C. The discovery of the intestinal protozoa of man. **Proc R Soc Med**, v. 13, p. 1-15, 1920.

DWEK, R. A. Glycobiology: "Towards understanding the function of sugars." **Biochemical Society Transactions**, v. 23, N. 1, p. 1-25, 1995.

ECKMANN, L. Mucosal defences against *Giardia*. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 5, p. 259-270, 2003.

EINARSSON, E; MA'AYEH, S; SVÄRD, S. G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current Opinion In Microbiology**, v. 34, p. 47-52, 2016.

ELMENDORF, H. G.; DAWSON, S. C.; MCCAFFERY, J. M. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **International Journal For Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 3-28, 2003.

EMBLEY, T. M.; GIEZEN, M. D.; HORNER, D; DYAL, P; BELL, S; FOSTER, P. Hydrogenosomes, Mitochondria and Early Eukaryotic Evolution. **Iubmb Life (International Union Of Biochemistry And Molecular Biology: Life)**, v. 55, n. 7, p. 387-395, 2003.

ESCOBEDO, A. A.; CIMERMAN, S. Giardiasis: a pharmacotherapy review. **Expert Opin Pharmacother.** 2007.

ESCOBEDO, A. A.; HANEVIK, K.; ALMIRALL, P.; CIMERMAN, S.; ALFONSO, M. Management of chronic *Giardia* infection. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 9, p. 1143-1157, 2014.

FARBNEY, M. D.; REYNOLDSON, J. A.; THOMPSON, R. C. A. In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. **International Journal For Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 593-599, 1995.

FARTHING, M. J. G. GIARDIASIS. **Gastroenterology Clinics Of North America**, v. 25, n. 3, p. 493-515, 1996.

FENG, Y.; XIAO, L. Zoonotic potencial and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, p. 110-140, 2011.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. Chamomile industrial profiles. **Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group**, 2005.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 114-128, 2001.

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

GUO, F.; XUE, C.; WU, C.; ZHAO, X.; QU, T.; HE, X.; GUO, Z.; ZHU, R. Immunoregulatory effects of Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide on chicks co-infected with avian leukosis virus and *Bordetella avium* early in ovo. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 2, p. 260–266, 2014.

GUO, Q.; SUN, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, L.; YAO, G.; LI, F.; YANG, X.; SONG, L.; JIANG, G. The effect of *Astragalus* polysaccharide on the Epstein-Barr virus lytic cycle. **Acta Virologica**, v. 58, n. 1, p. 76–80, 2014.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, F., ROMO-MANCILLAS, A., PUEBLA-PÉREZ, A. M., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M., & CASTILLO-ROMERO, A. Identification and molecular characterization of the tubulin-podophyllotoxin-type lignans binding site on *Giardia lamblia*. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 94, n. 6, p. 2031–2040, 2019.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, F.; PUEBLA-PÉREZ, A. M., GONZÁLEZ-POZOS, S., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M., PÉREZ-RANGEL, A., ALVAREZ, L. P., TAPIA-PASTRANA, G., & CASTILLO-ROMERO, A. Antigiardial Activity of

Podophyllotoxin-Type Lignans from *Bursera fagaroides* var. *Fagaroides*. *Molecules*, v. 22, n. 5, p. 1–12, 2017.

HETSKO, M. L.; MCCAFFERY, J. M.; SVÄRD, S. G.; MENG, TZE-CHIANG; QUE, XUCHU; GILLIN, F. D. Cellular and Transcriptional Changes during Excystation of *Giardia lamblia* in Vitro. **Experimental Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 172-183, 1998.

INGE, P. M. G.; FARTHING, M. J. G. A radiometric assay for anti-giardial drugs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 2, p. 345–347, 1987.

KANG, E. W., CLINCH, K., FURNEAUX, R. H., HARVEY, J. E., SCHOFIELD, P. J., & GERO, A. M. A novel and simple colorimetric method for screening *Giardia intestinalis* and anti-giardial activity in vitro. **Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229–234, 1998.

KARR, C. D.; JARROLL, E. L. Cyst wall synthase: n-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel n-acetylgalactosamine polysaccharide in the giardia cyst wall. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 1237-1243, 2004.

KOEHLER, A. V.; JEX, A. R.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. *Giardia/giardiasis* — A perspective on diagnostic and analytical tools. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 280-289, 2014.

LALLE, M. Giardiasis in the Post Genomic Era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. **Infectious Disorders - Drug Target**, v. 10, n. 4, p. 283-294, 2010.

LALLE, M.; HANEVIK, K. Infection and Drug Resistance Drive Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. **Infection and Drug Resistance**, p. 1921–1933, 2018.

LALLE, M.; HANEVIK, K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. **Infection And Drug Resistance**, v. 11, p. 1921-1933, 2018.

LAMBL, W. Mikroskopische untersuchungen der darm-excrete. *Vierteljahrsschr*  
LANE, S.; LLOYD, D. Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*. **Critical Reviews In Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 123-147, 2002.

LAROCQUE, R.; NAKAGAKI, K.; LEE, P.; ABDUL-WAHID, A.; FAUBERT, G. M. Oral Immunization of BALB/c Mice with *Giardia duodenalis* Recombinant Cyst Wall Protein Inhibits Shedding of Cysts. **Infection And Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5662-5669, 2003.

- LAURIENZO, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: an overview. **Marine Drugs**, v. 8, n. 9, p. 2435-2465, 2010.
- LAUWAET, T.; DAVIDS, B. J.; REINER, D. S.; GILLIN, F. D. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. **Current Opinion In Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 554-559, 2007.
- LEITSCH, D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 3, p. 128-135, 2015.
- LEMEE, V. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 819-821, 2000.
- LÉOPHONTE, P.; NEUKIRCH, F. Vaccination anti-pneumococcique: Place et indications dans la prévention des infections communautaires des voies respiratoires inférieures. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 31, n. 4, p. 181–194, 2001.
- LI, J., LI, M. Y., LI, Y. T., FENG, J. J., HAO, F. Q., & ZHANG, L. . Adjuvant activity of sargassum pallidum polysaccharides against combined newcastle disease, infectious bronchitis and avian influenza inactivated vaccines. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 2648–2660, 2012.
- LI, N., LI, L., FANG, J. C., WONG, J. H., NG, T. B., JIANG, Y., WANG, C. R., ZHANG, N. Y., WEN, T. Y., QU, L. Y., LV, P. Y., ZHAO, R., SHI, B., WANG, Y. P., WANG, X. Y., & LIU, F. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 3, p. 221–228, 2012.
- LORENZI, H.; DE A.MATOS, F. J. Plantas Mediciniais Do Brasil Nativas E Exóticas (2nd ed.). **Nova Odessa**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
- LUJAN, H. D.; MOWATT, M. R.; NASH, T. E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 61, p. 294-304, 1997.
- LUJÁN, H. D.; MOWATT, M. R.; NASH, T. E. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 3, p. 294-304. 1997.
- MAIA-BRIGAGÃO, C.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; SOUZA, W. de. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. **Parasitology International**, v. 61, n. 2, p. 280-287, jun. 2012.
- MANNA, D., DUTTA, P. K., ACHARI, B.; LOHIA, A. A novel galacto-glycerolipid from *Oxalis corniculata* kills *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4825–4832, 2010.

MEYER, E. A.; JARROL, E. L. Giardiasis. **Am J Epidemiol**, v. 111, p. 1-12, 1980.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H.; MAYRHOFER, G.; EY, P. L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 3, n. 1, p. 29-38, 2003.

MONIS, P. T.; CACCIO, S. M.; THOMPSON, R. C. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. **Trends Parasitol**, v. 25, p. 93-100, 2009.

MÜLLER, J.; SCHILDKNECHT, P.; MÜLLER, N. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (glNr2). **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1781-1789, 2013.

MÜLLER, J.; STERK, M.; HEMPHILL, A.; MÜLLER, N. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 280-287, 2007.

NABARRO, L.E.B.; LEVER, R.A.; ARMSTRONG, M.; CHIODINI, P.L. Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 21, n. 8, p. 791-796, 2015.

NASH, T. E. Treatment of *Giardia lamblia* infections. **Pediatr Infect Dis**, v. 20, p. 193-195, 2001.

NASH, T. E.; OHL, C. A.; THOMAS, E.; SUBRAMANIAN, G.; KEISER, P.; MOORE, T. A. Treatment of Patients with Refractory Giardiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 22-28, 2001.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; CHÁVEZ-SILVA, F.; ARGOTTE-RAMOS, R.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M. C.; CHAN-BACAB, M. J.; CEDILLO-RIVERA, R.; MOO-PUC, R.; HERNÁNDEZ-NUÑEZ, E. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 10, p. 3168-3171, 2011.

O'HARA, J.; BURET, A. G. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. **Front Biosci**, 2008.

OLIVEIRA, A. F.; LUZ, B. B.; WERNER, M. F. P.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M.C.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective activity of a pectic polysaccharide fraction obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves. **Phytomedicine**, v. 41, p. 7-12, 2018.

PAGET, T. A.; MACECHKO, P. T.; JARROLL, E. L. Metabolic Changes in *Giardia intestinalis* during Differentiation. **The Journal Of Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 222, abr. 1998.

PANARO, M. A.; CIANCIULLI, A.; MITOLO, V.; MITOLO, C. I.; ACQUAFREDDA, A.; BRANDONISIO, O.; CAVALLO, P. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 302-309, 2007.  
**Prakst Heikund**, v. 26, p.1-58, 1859.

PITTNER, E. et al. Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. **Revista Salus**, v. 1, n. 1, 2010.

PLATTS-MILLS, J.; BABJI, S.; BODHIDATTA, L.; GRATZ, J.; HAQUE, R.; HAVT, A.; MCCORMICK, B. J.; MCGRATH, M.; OLORTEGUI, M. P.; SAMIE, A. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (mal-ed). **The Lancet Global Health**, v. 3, n. 9, p. 564-575, 2015.

PRISCO, M. C.; HAGEL, I.; LYNCH, N. R.; JIMENEZ, J. C.; ROJAS, R.; GIL, M.; MATA, E. Association Between Giardiasis and Allergy. **Annals Of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 81, n. 3, p. 261-265, set. 1998.

PRUCCA, C., SLAVIN, I., QUIROGA, R. ET AL. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. **Nature**, v. 456, p. 750–754, 2008.

ROXSTRÖM-LINDQUIST, K.; PALM, D.; REINER, D.; RINGQVIST, E; SVÄRD, S. G. *Giardia* immunity – an update. **Trends In Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 26-31, 2006.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends In Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SCOTT, K. G. E.; YU, L. C. H.; BURET, A. G. Role of CD8+ and CD4+ T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3536-3542, 2004.

SHI, J., CHENG, C., ZHAO, H., JING, J., GONG, N., & LU, W. *In vivo* anti-radiation activities of the *Ulva pertusa* polysaccharides and polysaccharide-iron(III) complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 341–346, 2013.

SHI, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 37-48, 2016.

SHI, X. L., YAO, C. X., LIN, X., SHEN, L.; FENG, Y. The applications and research progresses of polysaccharide drugs. **Chinese Journal of New Drugs**, v. 23, n. 9, p. 1057–1062, 2014.

SINGH, O., KHANAM, Z., MISRA, N.; SRIVASTAVA, M. K. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. **Pharmacognosy Reviews**, 5(9), 82–95, 2011.

SOLARI, A. J.; RAHN, M. I.; SAURA, A.; LUJAN, H. D. A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. **Biocell**, v. 3, p. 329-46, 2003.

SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; SINGER, S. M. Host Immunity and Pathogen Strain Contribute to Intestinal Disaccharidase Impairment following Gut Infection. **The Journal Of Immunology**, v. 187, n. 7, p. 3769-3775, 2011.

SOLOMONS, N. W. Giardiasis: nutritional implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 859-869, 1982.

SOUSA, M. P., MATOS, M. E. O., MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L., & CRAVEIRO, A. A. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: **EUFC. Laboratório de Produtos Naturais**, 1991.

SOUSA, M. C. et al. Genotyping of *G. duodenalis* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. **Journal of Eukaryot Microbiology**, v. 53, p. S174-176, 2006.

TALLARIDA, R.J. Drug synergism: its detection and applications. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 298, p. 865–872, 2001.

TEJMAN-YARDEN, N.; MILLMAN, M.; LAUWAET, T.; DAVIDS, B. J.; GILLIN, F.D.; DUNN, L.; UPCROFT, J. A.; MIYAMOTO, Y.; ECKMANN, L. Impaired Parasite Attachment as Fitness Cost of Metronidazole Resistance in *Giardia lamblia*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4643-4651, 2011.

TOVAR, J., LEÓN-AVILA, G., SÁNCHEZ, L. et al. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. **Nature**, v. 426, p. 172–176, 2003.

TOWNSON, S. M.; LAQUA, H; UPCROFT, P; BOREHAM, P. F.L.; UPCROFT, J. A. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 521-522, 1992.

TROEGER, H.; EPPLE, H. J.; SCHNEIDER, T; WAHNSCHAFFE, U.; ULLRICH, R.; BURCHARD, G; D.; JELINEK, T.; ZEITZM, F. M.; SCHULZKE, J. D. Effect of

chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. **Gut**, v. 56, n. 3, p. 328-35, 2007.

ULAKOVA, L.; GALKIN, A.; CHEN, C. Z.; SOUTHALL, N.; MARUGAN, J J.; ZHENG, W.; HERZBERG, O. Discovery of Novel Antigiardiasis Drug Candidates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7303-7311, 2014.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 150-164, 2001.

VAMANU, E. Biological Activities of the Polysaccharides Produced in Submerged Culture of Two Edible *Pleurotus ostreatus* Mushrooms. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

VELÁZQUEZ-OLVERA, S.; SALGADO-ZAMORA, H.; JIMÉNEZ-CARDOSO, E.; CAMPOS-ALDRETE, M.E.; PÉREZ-GONZÁLEZ, C.; HADDA, T. B. In vitro anti-*Giardia lamblia* activity of 2-aryl-3-hydroxymethyl imidazo[1,2-a]pyridines and -pyrimidines, individually and in combination with albendazole. **Acta Tropica**, v. 155, p. 6-10, 2016.

WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on Mechanisms of In Vitro Antioxidant Activity of Polysaccharides. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

WEI, K., SUN, Z., YAN, Z., TAN, Y., WANG, H., ZHU, X., WANG, X., SHENG, P., & ZHU, R. Effects of Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharide on immune response of rabbit haemorrhagic disease tissue inactivated vaccine and on production performance of Rex rabbits. **Vaccine**, v. 29, n. 14, p. 2530–2536, 2011.

WIEMKEN, T. L., CARRICO, R. M., KLEIN, S. L., JONSSON, C. B., PEYRANI, P., KELLEY, R. R., ALIBERTI, S., BLASI, F., FERNANDEZ-GONZALEZ, R., LOPARDO, G.; RAMIREZ, J. A. The effectiveness of the polysaccharide pneumococcal vaccine for the prevention of hospitalizations due to *Streptococcus pneumoniae* community-acquired pneumonia in the elderly differs between the sexes: RESULTS from the Community-Acquired Pneumonia Organi. **Vaccine**, v. 32, n. 19, p. 2198–2203, 2014.

WOLFE, M s. Giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 1, p. 93-100, 1992.

WRIGHT, C. W., MELWANI, S. I., DAVID PHILLIPSON, J.; WARHURST, D. C. Determination of anti-giardial activity in vitro by means of soluble formazan production. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 517–519, 1992.



YE, Q.; TIAN, H.; CHEN, B; SHAO, J.; QIN, Y.; WEN, J. Giardia's primitive GPL biosynthesis pathways with parasitic adaptation 'patches': implications for giardia's evolutionary history and for finding targets against giardiasis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-1, 25 ago. 2017.

ZHANG, S. J.; KANG, Y. F. Advances in bio-active polysaccharides. *Science & Technology of Food Industry*, 38(2), 379–382, 2017.

## ANEXO 1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1) Peptidylarginine Deiminase Inhibition Abolishes the Production of Large Extracellular Vesicles From *Giardia intestinalis*, Affecting Host- Pathogen Interactions by Hindering Adhesion to Host Cells

Bruno Gavinho<sup>1</sup>, Bruna Sabatke<sup>2</sup>, Veronica Feijoli<sup>3</sup>, Izadora Volpato Rossi<sup>2</sup>, Janaina Macedo da Silva<sup>3</sup>, Ingrid Evans-Osses<sup>4</sup>, Giuseppe Palmisano<sup>3</sup>, Sigrun Lange<sup>5</sup> and Marcel Ivan Ramirez<sup>6,7\*</sup>

### **Abstract:**

*Giardia intestinalis* is a microaerophilic protozoan that is an important etiologic agent of diarrhea worldwide. There is evidence that under diverse conditions, the parasite is capable of shedding extracellular vesicles (EVs) which modulate the physiopathology of giardiasis. Here we describe new features of *G. intestinalis* EV production, revealing its capacity to shed two different enriched EV populations: large (LEV) and small extracellular vesicles (SEV) and identified relevant adhesion functions associated with the larger population. Proteomic analysis revealed differences in proteins relevant for virulence and host-pathogen interactions between the two EV subsets, such as cytoskeletal and anti-oxidative stress response proteins in LEVS. We assessed the effect of two recently identified inhibitors of EV release in mammalian cells, namely peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitor and cannabidiol (CBD), on EV release from *Giardia*. The compounds were both able to effectively reduce EV shedding, the PAD-inhibitor specifically affecting the release of LEVs and reducing parasite attachment to host cells in vitro. Our results suggest that LEVs and SEVs have a different role in host-pathogen interaction, and that treatment with EV-inhibitors may be a novel treatment strategy for recurrent giardiasis.

Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:417.  
doi: 10.3389/fcimb.2020.00417

## 2) Unveiling the role of EVs in anaerobic parasitic protozoa

Bruna Sabatke<sup>a</sup>, Bruno Gavinho<sup>b</sup>, Veronica Coceres<sup>c</sup>, Natalia de Miguel<sup>c</sup>, Marcel I. Ramirez<sup>d,e,\*</sup>

### **Abstract:**

The anaerobic or microaerophilic protozoan parasites such as the enteric human pathogens *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis* and urogenital tract parasites *Trichomonas vaginalis* are able to survival in an environment with oxygen deprivation. Despite living in hostile environments these pathogens adopted different strategies to survive within the hosts. Among them, the release of extracellular vesicles (EVs) has become an active endeavor in the study of pathogenesis for these parasites. EVs are heterogenous, membrane-limited structures that have played important roles in cellular communication, transferring information through cargo and modulating the immune system of the host. In this review, we described several aspects of the recently characterized EVs of the anaerobic protozoa, including their role in adhesion, modulation of the immune response and omics analysis to understand the potential of these EVs in the pathogenesis of these diseases caused by anaerobic parasites.

Molecular Immunology 133 (2021) 34–43.  
doi: 10.1016/j.molimm.2021.02.007

### 3) Trabalho submetido - 2021

Active learning tools improve the learning outcomes, scientific attitude and critical thinking in higher education: Experiences in an online course during the COVID-19 pandemic.

Revista: Biochemistry and Molecular Biology Education.

### 4) Trabalho submetido - 2021

Synergism effect of polysaccharides from chamomile tea in combination with albendazole or nitazoxanide increase efficiency against *Giardia duodenalis*.

Revista: Food Research International