



**Rita Mónica Ferraz
Ferreira de Oliveira**

**Avaliação, *in vitro*, da sensibilidade de *Giardia
lamblia* ao metronidazol**



Universidade de
Aveiro
2010

Departamento de Biologia

**Rita Mónica Ferraz
Ferreira de Oliveira**

**Avaliação, *in vitro*, da sensibilidade de *Giardia
lamblia* ao metronidazol**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Agostinho Cruz, Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto e do Professor Doutor Mário Jorge Pereira, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

à Elisa e à Joana

o júri

presidente

Professor Doutor Fernando José Mendes Gonçalves
Professor Associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Isaura Rosa Pinto de Sousa
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professor Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz
Professor Coordenador da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto

Professor Doutor Mário Jorge Verde Pereira
Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A todos os que contribuíram directa ou indirectamente para que este momento se tornasse uma realidade e que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho deixo o meu profundo agradecimento.

Ao Professor Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz, orientador deste trabalho, por quem nutro um grande respeito e admiração, pelos ensinamentos constantes que são para mim uma inspiração permanente. Pelo seu apoio e disponibilidade, pelas palavras de incentivo e pela amizade que ficará.

Ao Professor Doutor Mário Jorge Verde Pereira, co-orientador deste trabalho, pela forma atenta com que acompanhou este trabalho, pela paciência e por todo o apoio demonstrado. Pelo estímulo e amizade com que me ajudou a enfrentar os obstáculos.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto, nas pessoas das suas então directoras, Professora Doutora Cristina Prudêncio e Prof. Maria João Cunha, pelas facilidades concedidas para a frequência do mestrado e para a realização do trabalho experimental.

Ao Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental cujo apoio foi essencial à conclusão deste trabalho. Um agradecimento especial à Professora Doutora Maria Rosário Martins por me ter aberto portas que garantiram o sucesso do trabalho desenvolvido.

Ao Jorge, pelo companheirismo e pelo apoio incondicional. Pelas palavras sempre sábias que foram o conforto e um incentivo precioso. Por me ensinares que afinal valem os pequenos nada da vida. Pela amizade sincera, obrigada.

À Zeza, pelas conversas prolongadas, pelas risadas partilhadas, por todos os bons momentos. Pela confiança e pelo contagiado entusiasmo. Uma amiga sempre presente. Ficam as boas recordações e as saudades.

À Olívia, à Ci, ao César e ao Zé, obrigada pela ajuda preciosa, sem vocês a concretização deste trabalho não teria sido possível. Obrigada pela entrega, pela dedicação e pelas horas de descanso de que vos privei. Obrigada pela amizade demonstrada.

Aos colegas de trabalho que me acompanham todos os dias e que foram testemunhas de todas as fases, especialmente à Ana por ter estado presente desde o início e por me ter ajudado a ultrapassar os maus momentos.

Aos amigos de sempre e àqueles que vão fazendo parte e se instalam, pelos momentos de partilha, pelo carinho e por me suportarem também nos dias de nevoeiro. Com o vosso apoio foi possível. Obrigada por continuarem aí.

Aos meus pais por me terem ensinado, entre outros valores que regem a minha vida, que as coisas se conquistam trabalhando. Pela sua tolerância e por compreenderem as ausências. Pelo seu incansável apoio e incentivo permanente.

À Elisa e à Joana por serem os meus pilares permanentes e por terem sempre acreditado que eu seria capaz. Pelo estímulo, pela força e pela motivação. Por não me deixarem desanimar. Por tudo. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

palavras-chave

Giardia lamblia, resistência, sensibilidade, metronidazol, inibição de aderência, diacetato de fluoresceína, iodeto de propídio, derivado tetrazolium.

resumo

G. lamblia, agente causal da giardiose, é considerado o parasita protozoário patogénico mais frequente no intestino do Homem, associado a situações de grande morbidade em todo o mundo e a causa mais comum de diarreia em humanos. De todos os compostos disponíveis, o metronidazol continua a ser considerado o fármaco de eleição no tratamento desta parasitose. Contudo, o número crescente de casos de resistência registados tem vindo a justificar a necessidade de desenvolver metodologias que permitam avaliar a sensibilidade de *G. lamblia* aos fármacos disponíveis. Espera-se com este estudo contribuir para o desenvolvimento e implementação de metodologias expeditas que permitam avaliar, *in vitro*, a susceptibilidade deste parasita aos fármacos habitualmente prescritos. Pretende-se obter uma metodologia de simples execução, em microescala e portanto menos dispendiosa, que permita alcançar resultados mais rápidos e mais fiáveis. Neste sentido, este trabalho teve como objectivo determinar a sensibilidade de *G. lamblia* ao metronidazol recorrendo às metodologias de inibição de aderência (ADE), diacetato de fluoresceína (FDA), iodeto de propídio (PI) e um derivado tetrazolium (XTT). Foram obtidos valores de IC₅₀ de 2,99µM, 9,87µM e 8,93µM para a metodologia ADE, FDA e XTT, respectivamente. A metodologia PI não foi considerada uma vez que apresentou resultados incongruentes. Os resultados permitiram observar que as metodologias FDA e XTT apresentaram valores de IC₅₀ mais próximos. Na metodologia ADE, registaram-se valores cerca de três vezes inferiores. A selecção da melhor metodologia deve ter em conta o mecanismo de actuação do fármaco em estudo bem como a disponibilidade de equipamento necessário à execução das diferentes metodologias.

keywords

Giardia lamblia, resistance, sensibility, metronidazole, inhibition of adherence, fluorescein diacetate, propidium iodide, tetrazolium derivate.

abstract

G. lamblia, giardiasis cause, is the most frequent pathogenic protozoan found in human, associated with great morbidity in the whole world and most common cause for diarrhea. Metronidazole is the most often drug used in giardiasis treatment. However, the increasing number of metronidazole resistance cases justifies the need to develop *G. lamblia* viability assessment methodologies to other available drugs. It is hoped that this study contributes to the development and implementation of resourceful methodologies of *in vitro* susceptibility assessment of this parasite to commonly prescribed drugs. The aim is to obtain a simple methodology for microscale implementation, therefore less expensive, and to achieve faster and more reliable results. This study wanted to determine *G. lamblia* sensitivity to metronidazole using inhibition of adherence method (ADE), fluorogenic dyes fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) and a tetrazolium derivate (XTT) reduction. Sensibility results estimated IC₅₀ values of 2,99µM, 9,87µM and 8,93µM for ADE, FDA and XTT, respectively. PI was not considered due to inconsistent results. FDA and XTT IC₅₀ values were similar. Values obtained with ADE were three times lower. The best methodology selection must take into account the drug mechanism of action and the equipment availability to different methodologies implementation.

ÍNDICE

Capítulo I

Introdução geral	10
1. Enquadramento do tema	10
2. Objectivos	16
3. Estrutura da dissertação	18
4. Referências bibliográficas	19

Capítulo II

Giardiose e terapêuticas associadas, a review	26
--	-----------

Capítulo III

Metodologias que permitem avaliar a sensibilidade de <i>Giardia lamblia</i> a antiparasitários, a review	73
---	-----------

Capítulo IV

Avaliação da sensibilidade de <i>Giardia lamblia</i> ao metronidazol	97
---	-----------

Capítulo V

Discussão geral	122
------------------------	------------

Capítulo VI

Referências bibliográficas	138
-----------------------------------	------------

Anexos

Anexo I	142
Anexo II	143

Capítulo I

Introdução Geral

Capítulo I - Introdução Geral

1. Enquadramento do Tema

A infecção por parasitas ocorre habitualmente em todo o mundo, sendo as parasitoses intestinais as mais frequentes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2000), cerca de 3,5 biliões de indivíduos serão afectados por parasitoses intestinais (World Health Organization, 2000), constituindo um grave problema de saúde pública em todo o mundo, assumindo uma maior gravidade nos países em desenvolvimento (Stephenson *et al.*, 2000a; Stephenson *et al.*, 2000b; Hausen *et al.*, 2006). A mesma organização prevê ainda que no ano de 2025 mais de metade da população habite em áreas urbanas, onde se reúnem as condições ideais para a proliferação e transmissão de parasitas como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (World Health Organization, 2000).

No que respeita a *G. lamblia*, observado pela primeira vez em 1681 por Antonie Van Leeuwenhoek (Thompson *et al.*, 1993), e mais tarde descrito por Lambl, é um protozoário flagelado, também designado por *Giardia intestinalis* ou *Giardia duodenalis*, parasita de diversos mamíferos entre os quais o Homem (Ortega *et al.*, 1997; Gardner & Hill, 2001; Adam, 2001).

Considerado por Farthing *et al.*, (1986) o mais comum dos protozoários patogénicos, *G. lamblia* é o parasita mais frequente no intestino do Homem (Thompson *et al.*, 1994; Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006), estimando-se que 280 milhões de pessoas são infectadas todos os anos com este protozoário (World Health Organization, 2000; Wright *et al.*, 2003).

Este parasita é especialmente frequente em países em desenvolvimento, onde *G. lamblia* encontra condições propícias de proliferação e transmissão (Crompton & Savioli, 1993; World Health Organization, 2000), concretamente locais em que existem más condições sanitárias ou em estações de tratamento de água com funcionamento deficiente (Adam, 1991). A maior prevalência é observada em zonas tropicais e sub-tropicais, onde *G. lamblia* afecta mais de 30% da população (Minvielle *et al.*, 2008), sendo as crianças as principais afectadas (Adam, 1991).

Em Portugal são ainda escassos os estudos desenvolvidos a este nível. Contudo, foram já efectuados levantamentos epidemiológicos pontuais que sugeriram elevada frequência de *G. lamblia*, especialmente na população infantil, não se tendo observado um decréscimo acentuado na sua prevalência, contrariamente ao observado com outras parasitoses nomeadamente as helmintioses, como descrito por Cruz *et al.* (2002). Alguns autores apontaram mesmo a giardiose como a parasitose intestinal mais frequente no nosso país (Trinca *et al.*, 1990; Cabral *et al.*, 1991; Poiares da Silva, 1992).

Além do Homem, este protozoário intestinal foi também encontrado numa grande variedade de mamíferos, desde animais domésticos (como cães e gatos) até ao gado bovino e ovino. Estas observações têm levado a que diversos autores ao longo dos anos levarem a hipótese deste parasita poder ser considerado um agente zoonótico. O potencial zoonótico de *G. lamblia* pode revelar-se num importante problema de saúde pública uma vez que se verifica uma maior possibilidade de transmissão deste parasita ao Homem. Este facto justifica a necessidade de se desenvolverem estudos genéticos que permitam determinar os genótipos responsáveis por infectar as diferentes populações (Kasprzak *et al.*, 1989; Hopkins *et al.*, 1997; van Keulen *et al.*, 2002; Thompson, 2004; O'Handley *et al.*, 2006; Batchelor *et al.*, 2008).

O ciclo de vida deste protozoário engloba duas fases, a fase de trofozoíto, presente no intestino do hospedeiro, que alterna com a fase de quisto (Jones, 1991; Flanagan, 1992), estrutura de resistência e com um elevado poder infeccioso que, ao ser expelido juntamente com as fezes, constitui a forma responsável pela propagação da parasitose (Adam, 2001).

Após a ingestão dos quistos ocorre o desenquistamento no duodeno como resultado da exposição ao pH gástrico, extremamente ácido, e à acção de várias enzimas pancreáticas, provocando a libertação de dois trofozoítos por quisto. Os trofozoítos aderem à mucosa duodenal e do jejuno proximal, onde se reproduzem assexuadamente por divisão binária longitudinal. O processo de enquistamento, que permite a obtenção de quistos viáveis, inicia-se no ílio, em resposta a estímulos ainda não totalmente conhecidos (Vesny & Peterson, 1999; Adam, 2001).

As infecções humanas por *G. lamblia* ocorrem essencialmente por ingestão de águas contaminadas ou por contaminação fecal-oral directa (nomeadamente no caso das crianças) (Barwick *et al.*, 1997; Adam, 2001; Petri, 2003). Menos frequentemente podem ocorrer através da ingestão de alimentos contaminados (Pozio E., 2008).

A manifestação clínica da infecção por *G. lamblia* varia entre um quadro completamente assintomático até um sintomático. O período de incubação, desde a infecção, pode variar entre um a quarenta e cinco dias, verificando-se, na maior parte dos casos, períodos de incubação de três semanas até à manifestação dos primeiros sintomas. Este espaço de tempo permite a aderência do protozoário à mucosa intestinal e a sua dispersão pelo intestino o que dificulta o diagnóstico imediato da patogénese (Vesey & Peterson, 1999; Gardner & Hill, 2001).

Os principais sintomas registados nesta parasitose incluem diarreias crónicas, dores abdominais, náuseas com consequente falta de apetite, mal-estar generalizado com perda de peso acentuada, ocorrência ocasional de febre, vómitos e em casos extremos anorexia. Nos países em desenvolvimento esta parasitose encontra-se frequentemente associada a disfunções do equilíbrio nutricional, alterações gastrointestinais e/ou má absorção de nutrientes conduzindo à desnutrição o que compromete, consequentemente, o desenvolvimento físico e intelectual, especialmente das crianças (Stephenson *et al.*, 2000a; Adam, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007).

A metodologia clássica a que se recorre no diagnóstico da giardiose consiste no exame microscópico de fezes para pesquisa de quistos ou trofozoítos, após aplicação de uma técnica de concentração/enriquecimento (Rey, 1991). Métodos alternativos para a detecção incluem testes de detecção de antígenos através de ensaios imunoenzimáticos e detecção de parasitas por imunofluorescência, ambos disponíveis em kits comerciais (Mank, *et al.*, 1997; El-Shewy, 1999; Maraha & Buiting, 2000; Ali, *et al.*, 2003; Akhapkina, 2004).

Embora não existam ainda dados concretos relativamente à melhor terapêutica a aplicar numa situação de giardiose (Gardner & Hill, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007) e apesar das reacções adversas a que estão associados, habitualmente são prescritos nitroimidazóis, onde se inclui o metronidazol e o

tinidazol, e benzimidazóis onde se inclui o albendazol (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Valdez *et al.*, 2002; Ali & Nozaki, 2007; Escobedo & Cimerman, 2007). De todos, o metronidazol é o fármaco de primeira escolha no tratamento da giardiose (Lemée *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001; Arguello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Escobedo & Cimerman, 2007).

Os fármacos referidos encontram-se disponíveis em Portugal e todos são indicados no tratamento de giardiose (Infarmed, 2008). Apesar de relativamente bem tolerados, a comercialização em Portugal sob a forma de comprimidos dificulta a administração a crianças. No entanto, a introdução no mercado português do albendazol sob a forma de suspensão oral permitiu diminuir esta limitação (Tupam, 2002).

Não existindo muitas alternativas terapêuticas, e devido a uma prescrição indiscriminada de antiparasitários, são cada vez mais os casos de resistência registados (Lemée *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Arguello-García *et al.*, 2004), levando à necessidade de recorrer a outros fármacos (Lemée *et al.*, 2000; Abboud *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Gardner & Hill, 2001; Upcroft *et al.*, 2006; Ali & Nozaki, 2007; Escobedo & Cimerman, 2008).

Sendo a giardiose a parasitose intestinal patogénica mais frequente (Thompson *et al.*, 1994; Hausen *et al.*, 2006), torna-se indispensável o conhecimento da realidade no que respeita à resistência aos fármacos frequentemente utilizados no seu combate. Neste sentido, surge a necessidade de avaliar a sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* a diferentes quimioterápicos de forma a determinar o perfil de resistência/sensibilidade deste parasita aos fármacos habitualmente prescritos (Townson *et al.*, 1992; Upcroft *et al.*, 1993).

Os estudos contínuos no sentido de avaliar a resistência aos agentes tradicionais e que permitam desenvolver e implementar novas terapêuticas, adequadas ao tratamento da giardiose, estão portanto dependentes de ensaios que determinem a sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* após exposição ao agente antiparasitário em estudo.

Os métodos, *in vitro*, a que se recorre com mais frequência para determinar a viabilidade de trofozoítos após exposição ao agente antiparasitário são baseados na aderência dos mesmos à superfície de vidro/plástico do suporte de cultivo. Os resultados deste método dependem da distribuição homogênea das células aderentes pela superfície e partem do princípio que apenas as viáveis aderem, o que pode conduzir a resultados subjectivos (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003b). Além disso, as metodologias a que se recorre com frequência para avaliar a viabilidade celular são muitas vezes de difícil execução, demoradas e dispendiosas.

Numa tentativa de ultrapassar as limitações apresentadas pela metodologia que se baseia na perda da capacidade de aderência dos trofozoítos (ADE), foram desenvolvidos métodos alternativos que passam pela utilização de corantes e/ou fluorocromos (Arguello-García *et al.*, 2004).

Os métodos colorimétricos baseiam-se na determinação de mudanças de coloração, que pode ser observada por inspecção visual ou determinada por espectrofotometria, como acontece quando se recorre a sais tetrazolium, onde se inclui o XTT [2,3 - bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 5 - (fenilamnocarbonil - tetrazolium)]. Habitualmente utilizado para determinação da actividade celular, o XTT é incorporado pelas células viáveis, e portanto metabolicamente activas, onde é convertido pelas desidrogenases a formazan, produto responsável por uma mudança de coloração que permitirá a sua detecção (Wright *et al.*, 1992; Bénéré, *et al.*, 2007).

A viabilidade celular pode também ser determinada recorrendo à utilização de fluorocromos que, à semelhança dos corantes, se baseia na determinação de mudanças de coloração que pode ser detectada por microscopia de epifluorescência ou quantificados por espectrofluorimetria (Arguello-García *et al.*, 2004; molecular probes).

Os fluorocromos podem ser utilizados para a marcação de componentes celulares específicos, por ligações do marcador a moléculas estruturais e/ou funcionais, como é o caso do iodeto de propídio (PI). Este fluorocromo é utilizado para marcação do ADN, penetrando apenas nas células com membrana celular danificada e portanto consideradas não viáveis. A ligação do iodeto de propídio aos ácidos nucleicos das células forma um complexo fluorescente, o que permite a sua detecção (Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch *et al.*, 1991).

O recurso a fluorocromos permite ainda identificar células metabolicamente activas. Nesta situação, o fluorocromo é reduzido/convertido a um composto fluorescente na presença de actividade metabólica. O diacetato de fluoresceína (FDA) é um exemplo de um fluorocromo que penetra nas células com membrana celular intacta (células viáveis) e que, quando hidrolisado no citoplasma por acção das esterases, origina um composto (fluoresceína), que pelas suas propriedades fluorescentes permite detectar a viabilidade celular (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch *et al.*, 1991).

No seguimento do exposto e tendo por base a importância associada à avaliação da viabilidade celular como forma de conhecer o perfil de resistência/sensibilidade de *G. lamblia* a antiparasitários, torna-se necessário desenvolver novas metodologias que permitam, de uma forma simples, rápida, eficaz e económica, avaliar a sensibilidade deste parasita aos diferentes antiparasitários disponíveis.

O conhecimento do perfil de resistência/sensibilidade de *G. lamblia*, permitirá uma selecção mais adequada do composto a administrar a cada doente, contribuindo para uma terapêutica eficaz e para o uso racional dos medicamentos. Além disso, a detecção de situações de resistências aos fármacos habitualmente prescritos estimulará o desenvolvimento de novas moléculas que serão alternativas terapêuticas aos fármacos actualmente existentes.

2. Objectivos

O presente estudo teve como finalidade desenvolver e implementar uma metodologia que permita avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* ao metronidazol, fármaco habitualmente prescrito no tratamento desta parasitose. Pretende-se obter uma metodologia de simples execução, em microescala, e portanto menos dispendiosa, que permita alcançar resultados mais rápidos e mais fiáveis.

No sentido de dar cumprimento ao objectivo proposto estabeleceram-se duas etapas, concretamente:

1. Cultivo e manutenção, *in vitro*, de isolados axenizados de trofozoítos de *G. lamblia*.
2. Realização e comparação de diferentes metodologias que permitam determinar, *in vitro*, a sensibilidade de *G. lamblia* ao metronidazol.

Justificação das etapas e importância dos resultados no estado actual dos conhecimentos:

1. *G. lamblia* é considerado um dos parasitas intestinais mais frequentes a nível mundial com uma relevância clínica crescente na saúde pública e na medicina veterinária (Gardner & Hill, 2001; Hausen *et al.*, 2006; Savioli *et al.*, 2006; Bénéré *et al.*, 2007), o que torna o seu estudo necessário. A manutenção *in vitro* de *G. lamblia* (Meyer, 1976) permitiu aprofundar os conhecimentos sobre a parasitose da qual este protozoário é o agente causal. O ciclo de vida deste parasita comporta duas fases, a fase de trofozoíto e a fase de quisto (Vesly & Peterson, 1999; Adam, 2001), sendo habitualmente os estudos de diagnóstico e epidemiológicos desenvolvidos na fase de quisto (Pereira *et al.*, 2007; Dib *et al.*, 2008). No entanto, e uma vez que os trofozoítos constituem a forma responsável pela doença (Adam, 2001), a cultura de trofozoítos *in vitro* continua a ser a ferramenta laboratorial *standard* e fundamental para a investigação na descoberta de novos fármacos e avaliação de resistência. Assim, o cumprimento da primeira etapa permitirá, posteriormente, a implementação de metodologias que permitam avaliar o comportamento de *G. lamblia* ao metronidazol.

2. A giardiose é considerada uma importante doença parasitária em todo o mundo (Gardner & Hill, 2001; Hausen *et al.*, 2006; Savioli *et al.*, 2006; Bénéré *et al.*, 2007), cujo tratamento de eleição passa habitualmente pela administração de derivados 5-nitroimidazóis, dos quais se destaca o metronidazol (Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Argüello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Escobedo & Cimerman, 2008). Diversos estudos têm, no entanto, registado um aumento da frequência de casos de resistência aos fármacos habitualmente prescritos (Upcroft & Upcroft, 2001; Nash *et al.*, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003 ; Argüello-García *et al.*, 2004).

A detecção de situações de resistência revelou a necessidade de desenvolver ensaios que permitam determinar o perfil de resistência/sensibilidade de *G. lamblia* aos agentes antiparasitários disponíveis (Lemée *et al.*, 2000; Upcroft & Upcroft, 2001; Gardner & Hill, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Argüello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006).

Desta forma, o cumprimento da segunda etapa visa implementar metodologias que permitam avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de culturas de *G. lamblia* quando expostas ao metronidazol.

As metodologias de avaliação de sensibilidade serão uma ferramenta importante na selecção do fármaco mais adequado a cada situação clínica, garantindo uma terapêutica eficaz, o que irá contribuir de forma decisiva para o uso racional dos medicamentos. Por outro lado, permitindo detectar situações de resistência, os mesmos ensaios podem servir como ponto de partida ao desenvolvimento de novas moléculas que serão alternativas terapêuticas aos fármacos actualmente existentes.

Apesar de se reconhecer a sua importância, os ensaios *in vitro* que permitem avaliar a sensibilidade dos trofozoítos a um determinado composto são, na generalidade, realizados em tubos de cultura herméticos de grande volume (por isso dispendiosos), são ensaios trabalhosos, consomem muito tempo e traduzem poucos resultados. Deste modo, este trabalho permitirá desenvolver, implementar e comparar diferentes metodologias, alternativas às existentes, que permitam avaliar de forma rápida, eficaz e pouco dispendiosa a sensibilidade de *G. lamblia* aos fármacos usados no combate a esta parasitose.

3. Estrutura da Dissertação

Esta dissertação é constituída por seis capítulos. O primeiro corresponde à introdução geral. Os quatro capítulos que se seguem estão expostos na forma de artigos científicos, apresentando a estrutura sob a qual foram ou serão submetidos para publicação em revistas científicas da especialidade. O segundo capítulo, através de uma pesquisa bibliográfica, aborda os aspectos gerais a considerar numa situação de giardiose, bem como as terapêuticas disponíveis para o seu tratamento. O mesmo capítulo refere-se à existência de casos de falência da terapêutica, obrigando a uma maior discussão nas causas que a determinam, concretamente situações de resistência às terapêuticas implementadas. O terceiro capítulo traduz uma revisão bibliográfica das principais metodologias disponíveis que permitem determinar a sensibilidade/resistência da *G. lamblia* aos diferentes antiparasitários. Além de uma descrição do princípio do método pretende-se abordar as suas principais vantagens e limitações. As metodologias referidas assumem uma grande importância na medida em que permitirão determinar o perfil de resistência/sensibilidade de *G. lamblia* aos fármacos habitualmente prescritos. O quarto capítulo pretende reflectir o trabalho de investigação que foi desenvolvido, tendo como suporte os capítulos atrás referidos e no sentido de dar seguimento aos objectivos propostos. Este capítulo terá portanto como propósito determinar, *in vitro*, a sensibilidade de *G. lamblia* ao metronidazol, fármaco habitualmente prescrito no tratamento desta parasitose, recorrendo a diferentes metodologias. O quinto capítulo inclui, a discussão geral do trabalho aqui apresentado, onde se pretende efectuar uma comparação das diferentes metodologias desenvolvidas, fazendo uma análise crítica de cada uma. Por último, o sexto capítulo comporta a lista das referências bibliográficas utilizadas na sua realização e citadas nas diferentes partes em que se divide a dissertação.

4. Referências Bibliográficas

- Abboud, P., Lemée V., Gargala, G., Brasseur, P., Ballet, J. J., Borsa-Lebas, F., Caron, F. & Favennec, L.** 2001. Successful treatment of Metronidazol-and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.
- Adam, R. D.** 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.
- Adam, R. D.** 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.
- Akhapkina, I. G.** 2004. Detection of antibodies against Lamblia antigens in serum from atopic patients. *Klin Lab Diagn.* **4**:47-8.
- Ali, S. A. & Hill, D.R.** 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis.* **16 (5)**: 453:460.
- Ali, V. & Nozaki, T.** 2007. Current Therapeutics, their problems, and sulfur-containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by “Amitochondriate” Protozoan. *Clinical Microbiology Reviews.* **20 (1)**:164-187.
- Arguello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres, G..** 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.
- Barwick, R. S., Levy, D. A., Craun, G. F., Beach, M. J., Calderon, R. L.** 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ.* **49(4)**:1-21.
- Batchelor, D. J., Tzannes, S., Graham, P. A., Wastling, J. M., Pinchbeck, G. L. & German, A. J.** 2008. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. *Transbound Emerg Dis.* **55(2)**:99-104.
- Bénére, E., Luz, R. A., Vermeersch, M., Cos, P. & Maes, L.** 2007. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods.* **71(2)**:101-6.
- Bingham, A., Jarrill, E. & Meyer, E.** 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation *in vitro* and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47**:284-291.
- Cabral, M., Sousa I., Miranda, A., Martins, M. & Sousa, J. C.** 1991. Diagnóstico parasitológico de fezes em crianças de quatro infantários do Porto. *3º Congresso de Ciências Farmacêuticas e 1º Congresso de Farmacêuticos de Expressão Portuguesa.* Lisboa.

- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J., Martinez-Palomo, A., & Pierres, G.** 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Méd.* **22**:79-85.
- Crompton, D. W. & Savioli, L.** 1993. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull World Health Organ.* **71(1)**:1-7.
- Cruz, A., Cabral, M., Sousa, M. I. & Azeredo, Z.** 2002. Parasitoses intestinais. Estudo transversal em crianças de escolas do 1º ciclo da cidade do Porto. *Arq. Med.* **16**:211-218.
- Cruz, A., Sousa M. I., Azeredo, Z., Silva, M. C., Sousa, J. C. F., Manso, O. & Cabral, M.** 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.
- Dib, H. H., Lu, S. Q. & Wen, S. F.** 2008. Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res.* **103(2)**:239-51.
- El-Shewy, K. A & El-Hamshary, E. M.** 1999. Immunofluorescent detection of both *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* using anti-*Cryptosporidium* oocyst antibodies Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* **29(3)**:777-86.
- Escobedo, A. A. & Cimerman, S.** 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother.* **8(12)**:1885-902.
- Escobedo, A. A., Alvarez G., González M. E., Almirall, P., Cañete, R., Cimerman, S, Ruiz, A & Pérez, R.** 2008. The treatment of giardiasis in children: single-dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. Department of Microbiology, Pediatric Academic Hospital 'Pedro Borrás'. **102(3)**:199-207.
- Farthing, M. J., Mata, L., Urrutia, J. J. & Kronmal, R. A.** 1986. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. **43(3)**:395-405.
- Flanagan, P. A.** 1992. *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **109**:1-22.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R.** 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.
- Harris, J. C., Plummer, S. & Lloyd, D.** 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.
- Hausen, M. A., Freitas, J. C. Jr & Monteiro-Leal, L. H.** 2006. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol.* **113(3)**:135-41.

Howard, S. C., Donnell, C. A. & Chan, M. S. 2001. Methods for estimation of associations between multiple species parasite infections. *Parasitology* **122**(Pt2):233-251.

Ighogboja, I. S. & Ikeh, E. I. 1997. Parasitic agents in childhood diarrhoea and malnutrition. *West Afr. J. Med.* **16**:36-39.

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. 2008. [Online]. <http://www.infarmed.pt> (último acesso em 2008).

Jones, J. E. 1991. Giardiasis. *Primary Care* **18**:43-52.

Jones, K. H. & Senft, J. A. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem.***33**(1):77-9.

Kasprzak, W. & Pawlowski, Z.1989. Zoonotic aspects of giardiasis: a review. *Vet Parasitol.* **32**(2-3):101-8.

Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet, J. J. & Favennec L.. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *JAC.* **46**:819-821.

Ludwig, K. M., Frei, F., Filho, F. A. & Ribeiro-Paes, J. T. 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32**:547-555.

Mank, T. G., Zaat, J. O., Deelder, A. M., Van Eijk, J. T. & Polderman, A. M. 1997 Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. General Practitioners Laboratory, Haarlem, *The Netherlands.* **16**(8):615-9.

Maraha, B. & Buiting, A. G. 2000. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. Department of Medical Microbiology, St. Elisabeth Hospital, Tilburg, *The Netherlands.* **19**(6):485-7.

Meloni, B., Thompson, R., Reynoldson, J. & Seville, P. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

Meyer, E. A. 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol.* **27**:179-183.

Meyer, E. A. 1976. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* **39**:101-105.

Mineno, T. & Avery, M. A. 2003. *Giardiasis*: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.

Minvielle, M. C., Molina, N. B., Polverino, D. & Basualdo, J. A. 2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103(1)**:98-103.

Morgan, U. M., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. A. 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.

Nash, T. E., Christopher, A. O., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.

O'Handley, R. M. & Olson, M. E. 2006. *Giardiasis* and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **22(3)**:623-43.

Ortega, Y. R. & Adam, R. D. 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.

Pearce, D., Reynoldson, J. & Thompson, R. 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.

Pereira, M. G., Atwill, E. R. & Barbosa, A. P. 2007. Prevalence and associated risk factors for *Giardia lamblia* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **49(3)**:139-45.

Petri Jr, W. A. 2003. Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology.* **19(11)**:523-526.

Poiars da Silva, J. M. 1992. Parasitoses intestinais. Considerações sobre 14 anos de estudo laboratorial no concelho da Lousã. *Rev. Port. Doenç. Infec.* **4**:259-264.

Pozio, E., 2008. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia.* **50 (1-2)**: 17-24.

Rey, L. 1991. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan.

Sauch, J. F., Flanigan, D., Galvin, M. L., Berman, D. & Jakubowski, W. 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **57(11)**:3243-7.

Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A. 2006. *Giardia* and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* **22(5)**:203-8.

Schupp, D. G. & Erlandsen, S. L. 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* **53(4)**:704-7.

- Sousa, M. C. & Poiares da Silva, J.** 1999. A new method for assessing metronidazol susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2939-2942.
- Stephenson, L. S., Latham, M. C. & Ottesen, E. A.** 2000a. Global malnutrition. *Parasitology* **121**Suppl:S5-22.
- Stephenson, L. S., Latham, M. C. & Ottesen, E. A.** 2000b. Malnutrition and parasitic helminth infection. *Parasitology* **121** Suppl:S23-38.
- Thompson, R. C. A.** 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitology.* **126**:15-35.
- Thompson, R. C., Reynoldson, J. A. & Lymbery, A. J.** 1994. *Giardia: from molecules to disease*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Thompson, R. C., Reynoldson, J. A. & Mendis, A. H. W.** 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol.* **32**:72-160.
- Townson, S. M., Laqua, H., Upcroft, P., Boreham, P. & Upcroft, J.** 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.
- Trinca, A., Lobo, M. R. & Abranches, P.** 1990. Inquérito sobre parasitoses intestinais em três escolas primárias da área de Carnaxide (Lisboa). *Rev. Port. Doenç. Infec.* **1**:17-20.
- Tupam.** 2002 (Julho). *Índice nacional terapêutico*. Tupam editores, Lisboa.
- Upcroft, J. A. & Upcroft P.** 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.
- Upcroft, J. A. & Upcroft, P.** 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.
- Upcroft, J. A., Dunn, L. A., Wright, J. T., Benakli, K., Upcroft, P & Vanelle, P.** 2006. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50** (1):344-7.
- Valdez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Navarrete-Vázquez, G., Tapia, A., Cortés, R., Hernández, M. & Castillo, R.** 2002. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* **12**(16):2221-4.
- Van-Keulen, H., Macechko, P. T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P. M. & Erlandsen, S. L.** 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol.* **108**(2):97-107.

Vesy, C. J. & Peterson, W. L. 1999. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther.* **13(7)**:843-50.

World Health Organization (WHO). 2000. *Overcoming Antimicrobial Resistance.* World Health Report on Infectious Diseases. World Health Organization. [Online]. <http://www.who.int/infectious-disease-report> (último acesso em 2006).

Wright, C. W., Melwani, S., Phillipson, J. D., & Warhurst, D. C. 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Wright, J. M., Dunn, L. A., Upcroft, P. & Upcroft, J. A. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2(6)**:529-5541.

Capítulo II
Giardiose e Terapêuticas Associadas,
a Review

Giardiose e Terapêuticas Associadas, a Review

Rita F. Oliveira^{1,4,5}; Jorge Balteiro^{2,4}; Maria José Alves^{3,4}; Mário J. Pereira⁴; Agostinho Cruz¹

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 4000-294 Porto, Portugal

²Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-997 Coimbra, Portugal

³Hospital Distrital de Chaves, Laboratório de Patologia Clínica, 5400-279 Chaves, Portugal

⁴Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁵Corresponding author: rfo@estsp.ipp.pt; Phone. +351 22 206 1000; fax. +351 22 206 1001

Paper in draft form

Giardiose e Terapêuticas Associadas, a Review

Resumo:

Giardia lamblia, agente causal da giardiose, é considerado o parasita protozoário patogénico mais frequente no intestino do Homem, associado a situações de morbilidade em todo o mundo e a causa mais comum de diarreia em humanos. No ciclo de vida *G. lamblia* pode apresentar-se sob duas formas, o trofozoítio (que adere à mucosa intestinal e que é responsável por causar a doença) que alterna com o quisto (estrutura com elevado poder infeccioso que, ao ser expelido juntamente com as fezes, é responsável pela propagação da parasitose). As infecções humanas, que se devem sobretudo à ingestão de águas contaminadas, podem incluir infecções assintomáticas ou infecções sintomáticas caracterizadas por manifestações clínicas que podem englobar crises agudas de diarreia, distúrbios gastrointestinais, má absorção, dores abdominais e atraso no crescimento. Actualmente, as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da giardiose incluem essencialmente derivados 5-nitroimidazólicos (especialmente o metronidazol e o tinidazol) e fármacos benzimidazólicos (onde se inclui o albendazol). De todos, o metronidazol é, ainda hoje, o fármaco de eleição no tratamento desta parasitose. Contudo, o aumento do número de relatos de casos refractários com este grupo de fármacos e outros agentes anti-giardiais, devido especialmente ao desenvolvimento de resistências, tem aumentado a preocupação relativamente à melhor terapêutica a implementar levando à necessidade de pesquisa de outros compostos. Neste trabalho são analisados os aspectos mais relevantes a considerar numa situação de giardiose, na sua terapêutica, bem como na possibilidade da descoberta de novos compostos com actividade anti-giardial.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, giardiose, tratamento, antiparasitários, resistência.

Abstract:

Giardia lamblia, causal agent of giardiasis, is considered the most frequent pathogenic protozoan in the human intestine, associated to situations of morbidity throughout the world and the most frequent cause of diarrhea in humans. *G lamblia* may present itself in two forms during its life cycle, trophozoite (which adheres to the intestinal mucous membrane and is responsible for causing the disease) which alternates with the cyst (a structure with high infectious capacity, that when expelled along with the faeces, is responsible for the propagation of giardiasis). Human infections, which are due mostly to the ingestion of contaminated water, may include asymptomatic or symptomatic infections characterized by clinical displays which may include acute diarrhea crises, gastrointestinal disorders, bad absorption, abdominal pain and slowness in growth. Currently, the available therapeutic options for the treatment of giardiasis essentially include 5-nitroimidazolics (especially metronidazol and tinidazol) and benzimidazolic drugs (including albendazol). Amongst all, metronidazol is still the preferred drug in the treatment of giardiasis. However, the growing number of refractory cases with this group of drugs and other anti-giardial agents, due mostly to the development of resistance, has increased the concern regarding the best therapeutics to implement leading to the need to search for other components. This research analyses the most relevant aspects to consider in the situation of giardiasis, in its therapeutics, as well as in the possibility of discovering new compounds with anti-giardial activity.

Keywords: *Giardia lamblia*, giardiasis, treatment, anti-giardial agents, resistance.

1. Introdução

As parasitoses intestinais constituem um grave problema de saúde pública em todos os países, assumindo maior gravidade nos países em desenvolvimento (Stephenson *et al.*, 2000a; Stephenson *et al.*, 2000b; Hausen *et al.*, 2006).

A estas infecções estão frequentemente associadas diarreia crónica e, nos países em desenvolvimento desnutrição comprometendo, conseqüentemente, o desenvolvimento físico e intelectual, particularmente das faixas etárias mais jovens da população (Ighogboja & Ikeh, 1997; Ludwig, *et al.*, 1999; Stephenson *et al.*, 2000a, Howard, *et al.*, 2001).

Os dados avançados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para 3,5 biliões de pessoas afectadas por parasitas intestinais. Este organismo prevê ainda que no ano de 2025, mais de metade da população dos países em desenvolvimento habite em áreas urbanas, onde se reúnem as condições ideais para a proliferação e transmissão de parasitas como a *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Giardia lamblia* (World Health Organization, 2000). A OMS estima também que, no que respeita a *G. lamblia*, todos os anos sejam infectadas duzentos e oitenta milhões de pessoas (Wright *et al.*, 2003).

G. lamblia também denominado por *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*, é um protozoário unicelular flagelado que habita o intestino delgado de humanos e outros mamíferos (Ortega & Adam, 1997; Gardner & Hill, 2001; Adam, 2001), sendo considerado o parasita patogénico mais frequente no intestino do Homem (Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006).

Infecções por *G. lamblia*, agente causal da giardiose, são especialmente frequentes em locais onde existam fracas condições de higiene, más condições sanitárias, estações de tratamento de água com funcionamento deficiente e elevada densidade populacional, (World Health Organization, 2000; Mineno & Avery, 2003).

Estudos de índole epidemiológica sugerem que, também em Portugal, esta parasitose tem grande importância sendo as crianças as principais afectadas, com frequências a variar entre 9 e 28% em crianças e jovens até aos 16 anos (Trinca *et al.*, 1990; Cabral *et al.*, 1991; Poiães da Silva, 1992). Um estudo recente na população portuguesa de Cruz *et al.* (2002), com 471 crianças de idades compreendidas entre os 5 e os 13 anos, revelou ser a giardiose a parasitose mais repetida apresentando uma frequência de 10,2%.

O combate eficaz a esta parasitose está dependente do conhecimento da biologia, epidemiologia, diagnóstico, tratamento e profilaxia. Neste sentido, verificou-se que os estudos com *G. lamblia* sofreram um incremento significativo após o isolamento e axenização da primeira estirpe obtida a partir de um paciente de Portland, nos Estados Unidos, em 1976 (Bingham *et al.*, 1979).

Este parasita apresenta um ciclo de vida monoxeno em que a fase de trofozoíto, presente na mucosa do intestino delgado do hospedeiro, alterna com a fase de quisto, estrutura de resistência, capaz de sobreviver no ambiente externo ao hospedeiro e dotado de um elevado poder infeccioso, que ao ser expelido juntamente com as fezes constitui a forma responsável pela propagação da parasitose (Vesey & Peterson, 1999; Adam, 2001).

As infecções humanas por *G. lamblia* resultam, essencialmente, da ingestão de águas contaminadas ou por contaminação fecal-oral directa (Adam, 2001; Petri, 2003; Mineno & Avery, 2003).

A giardiose caracteriza-se por manifestações clínicas que incluem infecções assintomáticas e infecções sintomáticas habitualmente associadas a alterações gastrointestinais, particularmente na criança (Stephenson *et al.*, 2000a; Adam, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007)

No sentido de atenuar os sintomas decorrentes de uma infecção por *G. lamblia*, evitando assim a evolução da doença, têm sido propostas diferentes alternativas terapêuticas que permitam o seu tratamento efectivo (Sousa & Poiães da Silva, 1999; Arguello-Garcia *et al.*, 2004; Escobedo & Cimerman, 2007).

Apesar dos efeitos adversos que lhe estão associados, de todos os fármacos descritos, o metronidazol é ainda hoje o fármaco a que se recorre com mais frequência. Contudo, o albendazol e o tinidazol são fármacos também prescritos (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Valdez *et al.*, 2002; Arguello-Garcia *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Ali & Nozaki, 2007; Escobedo & Cimerman, 2007).

Pelo facto de existir uma prescrição indiscriminada de antiparasitários, a falência do tratamento tem-se revelado cada vez mais frequente. A resistência que os organismos desenvolvem aos fármacos tem-se revelado o principal motivo implicado no insucesso da terapêutica implementada (Upcroft *et al.*, 1999; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

A resistência apresentada pela *G. lamblia* surge frequentemente associada aos agentes anti-giardiais de uso tradicional, como o metronidazol (Lemée *et al.*, 2000; Abboud *et al.*, 2001). Porém, casos de resistência foram já descritos para outros fármacos, nomeadamente para o albendazol, a quinacrina e a furazolidona (Upcroft & Upcroft, 2001).

Este estudo surge com o objectivo de compilar a informação relevante existente relativamente à temática que é a giardiose e as alternativas terapêuticas disponíveis para o seu tratamento.

2. *Giardia lamblia*

Identificada pela primeira vez por Antonie Van Leeuwenhoek, em 1681 (Thompson *et al.*, 1993), *G. lamblia* foi mais tarde descrita com maior detalhe por Lambl quando decorria o ano de 1859 (Ortega & Adam, 1997; Adam, 2001).

No seu ciclo de vida *G. lamblia* pode encontrar-se sob duas formas: o quisto inactivo que infecta o hospedeiro e o trofozoíto que causa a doença (Adam, 2001).

Os **trofozoítos** de *G. lamblia* são piriformes e têm aproximadamente 12 a 15µm de comprimento e entre 5 e 9µm de largura. O citoesqueleto inclui dois axonemas, quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral), que lhes asseguram a locomoção, e um disco suctorial ventral (Adam, 2001). O disco ventral surge como uma estrutura côncava, com profundidade máxima de 0,4µm, cobrindo a superfície ventral completa (Adam, 2001), podendo, no entanto, variar de forma e tamanho. Os trofozoítos apresentam dois núcleos, com cariossoma central, sem nucleolos, que estão localizados anteriormente e são simétricos em relação ao plano longitudinal. No citoplasma encontram-se os vacúolos, lisossomas, grânulos de glicogénio e grânulos ribossomais (Adam, 2001). A existência de Complexos de Golgi nos trofozoítos não foi totalmente confirmada, havendo porém estruturas que sugerem a sua presença (Gillin *et al.*, 1996; Adam, 2001).

A fase de trofozoíto alterna com a fase de **quisto**, estrutura que surge na sequência do enquistamento. Apresenta habitualmente forma oval, paredes lisas e aproximadamente 5 por 7 a 10µm de diâmetro. Uma vez que o enquistamento ocorre após a replicação nuclear nos organismos, mas antes da citocinese, os quistos em fase de maturação avançada irão exibir uma duplicação das estruturas existentes nos trofozoítos, apresentando quatro núcleos e quatro axonemas. Esta estrutura encontra-se coberta por uma parede espessa de 0,3 a 0,5µm, composta por uma camada exterior de filamentos e uma camada membranosa interna constituída por duas membranas (Adam, 2001).

O quisto constitui a forma infectante para o Homem, habitualmente através da ingestão de águas contaminadas. O desenquistamento é um processo complexo que ocorre em resposta a mudanças relativamente rápidas e extremas na temperatura e no pH, assim como a exposição a proteases intestinais. No mamífero hospedeiro, a exposição dos quistos a um pH ácido, que se verifica durante a sua passagem pelo estômago, induz o **desenquistamento**, no entanto o trofozoíto apenas emerge do quisto após a sua passagem para o intestino delgado (Bingham & Meyer, 1979; Adam, 2001).

Face a esta hipótese, foi possível induzir o desenquistamento *in vitro*, expondo quistos de origem animal e humana a soluções de ácido clorídrico aquoso (Bingham & Meyer, 1979; Cedillo-Rivera *et al.*, 1991), tendo o desenquistamento óptimo ocorrido com exposição a um pH entre 1,3 e 2,7 (Bingham & Meyer, 1979). É por isso necessário adaptar o processo às condições fisiológicas que existem no estômago e no duodeno, tendo-se verificado que o desenquistamento pode ocorrer com níveis de pH mais altos (i.e. pH 4,0 e 6,2) e com maiores períodos de exposição à acidez estomacal (Bingham, *et al.*, 1979).

Após este processo, o parasita divide-se assexuadamente por divisão binária colonizando o intestino delgado do hospedeiro, predominantemente o jejuno (Bingham & Meyer, 1979; Adam, 2001).

Os trofozoítos ligam-se às células epiteliais do intestino através do seu disco ventral aderente (Gillin *et al.*, 1996), onde obtêm os nutrientes de que necessitam e evitam, ao mesmo tempo, o transporte ao longo do intestino delgado, impedindo que seja eliminado pelo peristaltismo intestinal. A aderência do disco ventral depende do mecanismo activo e é inibida por temperaturas inferiores a 37°C, níveis de oxigénio muito altos ou concentrações de cisteína reduzidas (Gillin & Reiner, 1982).

À medida que os trofozoítos se replicam e colonizam a superfície do intestino, alguns enquistam no jejuno após exposição a secreções biliares (Gillin *et al.*, 1996; Lujan *et al.*, 1997).

O processo de **enquistamento** que ocorre no jejuno envolve duas fases. A fase inicial consiste na síntese intracelular e transporte dos componentes da parede quística.

Segue-se uma segunda fase em que se inicia, na membrana plasmática do trofozoíto, a formação da parede quística (Adam, 2001). Durante este processo, o trofozoíto adquire uma aparência globulosa pois o parasita enrola-se sobre si mesmo, tornando-se progressivamente arredondado. Ocorre perda da capacidade de aderência, uma vez que desaparece o disco ventral, e perda de qualquer tipo de mobilidade, pelo facto dos flagelos passarem para o citoplasma (Adam, 2001).

Para promover o enquistamento *in vitro* torna-se fundamental reunir um conjunto de condições semelhantes às necessárias para que o processo ocorra *in vivo*, ou seja, aumentar a concentração de ácidos biliares no meio de cultura e alterar o pH de 7,0 para 7,8 (Gillin *et al.*, 1989). Estas condições são semelhantes às do jejuno, local onde ocorre o enquistamento no hospedeiro.

3. Giardiose

Apesar de na maior parte das vezes não ser letal, *G. lamblia* é um protozoário causador de grande morbidade em todo o mundo (Gardner & Hill, 2001), constituindo o parasita patogénico intestinal mais frequente em humanos (Vanacova *et al.*, 2003) e a causa mais comum de diarreia crónica em viajantes (Farthing, 1996).

A sua prevalência a nível mundial varia entre 2 e 5% (Kappus *et al.*, 1994) e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 280 milhões de pessoas sejam infectadas todos os anos com este parasita (Wright *et al.*, 2003).

A maior prevalência é encontrada em zonas tropicais e sub-tropicais, em que *G. lamblia* afecta mais de 30% da população (Minvielle *et al.*, 2008), em áreas onde existem más condições sanitárias ou em estações de tratamento de água com funcionamento deficiente. Este parasita é especialmente frequente em países em desenvolvimento, onde *G. lamblia* encontra condições propícias de proliferação e transmissão (Crompton & Savioli, 1993; World Health Organization, 2000), podendo nestes locais a sua prevalência atingir valores entre 20 a 30% (Ortega & Adam, 1997). A infecção por este parasita está habitualmente associada à pobreza, às condições sanitárias deficientes, aos cuidados de saúde insuficientes e à superpopulação (Mineno & Avery, 2003).

Embora afecte todos os grupos etários, nas crianças dos países em desenvolvimento, a giardiose é o primeiro agente patogénico entérico a originar infecções (Castro, 2001). As crianças surgem assim como as maiores afectadas pela doença (Adam, 1991), apresentando prevalências superiores, chegando a atingir frequências de 5% em países como a Nigéria (Enekwechi & Azubike, 1994), a Espanha (Armengol *et al.*, 1997) até valores da ordem dos 34-62% no Chile (Navarrete & Torres, 1994) e na Palestina (Yassin *et al.*, 1999).

Em Portugal existem poucos trabalhos desenvolvidos sobre esta problemática. Os poucos estudos epidemiológicos realizados têm revelado que a frequência da giardiose varia entre 9 e 28% em crianças e jovens até aos dezasseis anos.

Os valores apontados por alguns autores sugerem que, também em Portugal, esta parasitose tem enorme importância (Cabral *et al.*, 1991; Poiaras da Silva, 1992; Cruz *et al.*, 2002).

Poiaras da Silva (1992) realizou um estudo no concelho da Lousã, por um período de catorze anos, tendo verificado um decréscimo significativo das helmintoses (10,4% em 1978 para 1,5% em 1991) e uma redução não tão expressiva na ocorrência de giardiose (16,0% em 1978 para 11,0% em 1991). Nos trabalhos de Cabral *et al.* (1991) a giardiose surge como a parasitose mais comum. Mais recentemente, Cruz *et al.* (2002) realizaram um estudo com crianças entre os cinco e os treze anos, que revelou haver uma prevalência de 10,2% de giardiose entre os 471 sujeitos envolvidos na investigação.

Os valores elevados de giardiose podem dever-se a características próprias da própria parasitose, como seja o facto de ser necessária uma dose muito baixa de quistos para ocorrer a infecção (10 quistos) (Vesey & Peterson, 1999; Wright *et al.*, 2003). Além disso, os quistos são infecciosos a partir do momento em que são excretados pelas fezes, podendo sobreviver durante semanas ou meses no meio ambiente, o que aumenta o risco de contaminação de água e de alimentos (Pierangeli *et al.*, 2003; Caccio *et al.*, 2005).

Os trofozoítos podem ser excretados na fase de diarreia aguda da infecção, mas não se tornam infecciosos, pois não sobrevivem fora do hospedeiro por muito tempo e são sensíveis ao suco gástrico (Lujan *et al.*, 1997). Assim, apenas os quistos podem sobreviver fora do hospedeiro.

As infecções humanas por *G. lamblia* resultam essencialmente da ingestão de águas contaminadas ou por contaminação fecal-oral directa, especialmente no caso das crianças (Adam, 2001; Petri, 2003). A transmissão pode também dever-se ao contacto entre pessoas (Caccio *et al.*, 2005), contribuindo para um maior risco de contaminação em centros de dia, infantários, escolas e lares de terceira idade, o que faz com que as crianças e idosos corram maior risco de serem contaminados. Embora com menos frequência, a transmissão pode também ocorrer através de alimentos contaminados (Pozio E., 2008).

Estudos recentes têm reforçado a ideia de que, infecções por *G. lamblia* podem também ocorrer por transmissão zoonótica. Esta conclusão justifica-se pelo facto deste parasita poder infectar outros mamíferos que não o Homem, incluindo gatos, cães, porcos, ovelhas, cavalos, vacas, entre outros (Van Keulen *et al.*, 2002; Thompson, 2004; O'Handley *et al.*, 2006; Batchelor *et al.*, 2008).

G. lamblia não é um parasita invasivo, vive e multiplica-se na superfície do lúmen do intestino do seu hospedeiro (Thompson, 2004). A patogénese não está completamente clarificada e os sintomas da doença podem ser variáveis e podem não ser evidentes num número significativo de indivíduos infectados (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 1996; Adam, 2001). Além disso, importa referir que, embora variáveis, a giardiose é habitualmente caracterizada por um período de incubação que dura entre uma a duas semanas (Ali & Nozaki, 2007).

Dependendo da resposta imunitária do hospedeiro e da própria estirpe da *G. lamblia*, o paciente pode manter-se assintomático, ou, em casos mais graves, apresentar infecções sintomáticas geralmente caracterizadas por manifestações clínicas que incluem crises agudas de diarreia, distúrbios gastrointestinais, má absorção, dores abdominais e atraso no crescimento, particularmente na criança (Olson, 2000; Stephenson *et al.*, 2000a; Adam, 2001; Cruz *et al.*, 2003b; Escobedo & Cimerman, 2007; Ali & Nozaki, 2007).

O período agudo dos sintomas tem a duração de três a quatro dias (Upcroft & Upcroft, 2001; Ali & Nozaki, 2007).

4. Tratamento da Giardiose

Apesar de muitos hospedeiros de *G. lamblia* permanecerem assintomáticos, é de opinião geral que cargas parasitárias elevadas prejudicam o seu bem-estar geral. Além disso, os indivíduos assintomáticos constituem um risco pois, sendo portadores, podem transmitir a infecção (Adam, 2001). Quando habitam regiões não endêmicas e sempre que identificados, estes indivíduos devem ser tratados no sentido de diminuir a disseminação da parasitose (Cruz *et al.*, 2003), e/ou impedir o agravamento da doença.

Embora outras doenças gastrointestinais possam apresentar sintomas semelhantes à giardiose, infecções por *G. lamblia* são frequentes o suficiente para estarem presentes quando outras patologias são responsáveis pela sintomatologia (Nash *et al.*, 2001). Nos pacientes com história de exposição à *G. lamblia* e com sintomatologia consistente com giardiose, mas cujos exames de diagnóstico às fezes sejam negativos, o tratamento empírico é recomendável devido a dificuldades na sensibilidade dos testes de diagnósticos (Petri, 2003).

O tratamento da giardiose tem portanto como objectivo, não só eliminar os sintomas, evitando a evolução da doença, mas especialmente erradicar a parasitose, evitando a sua transmissão (Sousa & Poiães da Silva, 1999; Argüello-García *et al.*, 2004; Escobedo & Cimerman, 2007).

Apesar de ser considerada uma infecção comum, existe ainda uma grande falta de linhas orientadoras no que respeita a um tratamento eficiente da giardiose (Zaat *et al.*, 1997). Os estudos desenvolvidos no sentido de estabelecer o tratamento mais indicado para a parasitose têm-se mostrado inoperantes (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001), uma vez que, apesar da terapia farmacológica disponível ser eficaz, um grande número de fármacos apresenta efeitos adversos que restringem a sua utilização (Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Valdez *et al.*, 2002). Para além disso, nem todos os fármacos se encontram disponíveis em todos os países, o que dificulta a implementação de um tratamento *standard* (Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001).

Alguns fármacos apresentam uma eficácia bem estudada tendo sido aceites para o tratamento da infecção por *G. lamblia*. As taxas de cura variam para os diferentes esquemas terapêuticos, sendo frequentemente descritos como superiores a 90% (Nash *et al.*, 2001).

Nos fármacos disponíveis para o tratamento de giardiose incluem-se, entre outros, o metronidazol, o tinidazol, o secnidazol, o ornidazol, a quinacrina, a furazolidona e a paromomicina. Posteriormente surgiram o albendazol e a nitazoxanida (Abboud *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Argüello-García *et al.*, 2004).

No quadro 1, encontram-se descritos alguns fármacos e respectivas posologias recomendadas para o tratamento da Giardiose, tanto em pediatria como em pacientes adultos (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001; Cohen, 2005; Infarmed, 2008).

Quadro 1. Fármacos e doses usados no tratamento de infecções por *G. lamblia* (adaptado de Gardner & Hill; 2001; Nash *et al.*, 2001; Cohen, 2005; Infarmed, 2008)

FÁRMACO	DOSAGEM PARA ADULTOS	DOSAGEM PARA PEDIATRIA	DISPONIBILIDADE EM PORTUGAL
Metronidazol (5-nitroimidazol)	250mg3x/diax5-7dias	5mg/kg3x/diax5-7dias	Comprimidos revestidos com 250mg Com indicação para Giardiose
Tinidazol (5-nitroimidazol)	2g/diax1 dia	50mg/kg/diax1dia Máximo 2g	Comprimidos revestidos com 500mg Com indicação para Giardiose
Secnidazol (5-nitroimidazol)	2g/diax1 dia	25-30mg/kg/diax1dia	Comprimidos revestidos com 500mg
Ornidazol (5-nitroimidazol)	2g/diax1 dia	40-50mg/kg/diax1dia Máximo 2g	Indisponível
Quinacrina	100mg3x/diax5-7dias	2mg/kg3x/diax5-7dias	Indisponível
Furazolidona	100mg4x/diax7-10 dias	2mg/kg4x/diax10dias	Indisponível
Paromomicina	500mg3x/diax5-10dias	30mg/kg em 3 doses x 5-10dias	Indisponível
Albendazol (Benzimidazol)	400mg/diax10dias	15mg/kg/diax10dias Máximo 400mg	Suspensão oral 20mg/mL com 20mL Comprimidos com 200mg Com indicação para Giardiose
Nitazoxanida	500mg2x/diax3dias	100mg2x/diax3dias (12-47 meses) 200mg2x/diax3dias (4-11 anos)	Indisponível

De todos os fármacos referidos, o metronidazol (pertencente ao grupo dos 5-nitroimidazóis) e o albendazol (pertencente ao grupo dos benzimidazóis) são considerados os fármacos mais prescritos na prática clínica no combate a esta parasitose (Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Argüello-García *et al.*, 2004).

Devido à sua eficácia, biodisponibilidade, baixo custo e boa tolerância, o metronidazol é o fármaco de eleição no tratamento da giardiose (Lemée *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001; Argüello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Escobedo & Cimerman, 2007; Rosenblatt, 1992).

Tendo em conta que a variedade de fármacos eficazes no tratamento das infecções por *G. lamblia* é limitado e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é um processo dispendioso, a administração prudente dos fármacos existentes torna-se muito importante (Upcroft & Upcroft, 1993).

Apesar das terapêuticas implementadas serem habitualmente eficazes no tratamento desta parasitose, situações de falência terapêutica têm sido descritas cada vez com maior frequência (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Argüello-García *et al.*, 2004). Este facto tem vindo a justificar a necessidade de recorrer a outros fármacos que sejam alternativas terapêuticas (Quadro 2) numa situação de giardiose. Além disso, as diferentes sensibilidades e efeitos adversos apresentados por cada indivíduo justificam a necessidade de recorrer a outros fármacos (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001).

Quadro 2. Alternativas terapêuticas para o tratamento da infecção por *G. lamblia* (Nash *et al.*, 2001).

FÁRMACO	EFICÁCIA OU SUSCEPTIBILIDADE
Bacitracina	<i>In vivo</i> (homem)
Neomicina	<i>In vivo</i> (homem)
DL-propranolol	<i>In vivo</i> (homem); D-propranolol <i>in vitro</i>
Niridazol	<i>In vivo</i> (rato)
Nitrofurantoína	<i>In vivo</i> (rato)
Dissulfiram	<i>In vivo</i> (rato)
Formonomentina	<i>In vivo</i> (rato)
Fenbendazole	<i>In vivo</i> (cão, vitelo)
Doxiciclina	<i>In vitro</i>
Monensina de sódio	<i>In vitro</i>
Atorvastatina	<i>In vitro</i>
Ciprofloxacina	<i>In vitro</i>

4.1. Metronidazol

Considerado um fármaco antiprotozoário, o metronidazol foi descoberto no final da década de 1950 mostrando-se eficaz contra a *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*. Posteriormente, em 1962, Darbon *et al.* descreveram que podia ser utilizado para tratar infecções por *G. lamblia* (Gardner & Hill, 2001; Martinez & Caumes, 2001).

Desde 1980 que se têm vindo a realizar ensaios *in vitro* para testar a susceptibilidade da *G. lamblia* aos 5-nitroimidazóis, principal arma terapêutica usada na prática clínica para combater a giardiose (Gardner & Hill, 2001). Além do metronidazol, fazem parte do mesmo grupo o tinidazol, o ornidazol e o secnidazol (Harris *et al.*, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007). De todos, o metronidazol e o tinidazol são os fármacos que têm exibido maior actividade *in vitro*, com uma ligeira vantagem para o tinidazol (Jokipii & Jokipii, 1980; Boreham *et al.*, 1985; Gordts *et al.*, 1985; Crouch *et al.*, 1986).

Apesar de ser ligeiramente menos eficaz do que a quinacrina, com taxas de cura entre 80 e 95%, o metronidazol é melhor tolerado apresentando também uma boa relação custo/benefício (Freeman *et al.*, 1997).

Apesar dos efeitos adversos a que está associado e das resistências já relatadas por diversos estudos, o metronidazol apresenta eficácia comprovada contra a Giardiose. Além disso, é um fármaco produzido a baixo custo e, de uma forma geral, bem tolerado, factores que justificam o facto de ser o fármaco utilizado com maior frequência no combate a esta parasitose (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2007).

Após a administração oral, o metronidazol é rapidamente absorvido e atinge os tecidos corporais e as secreções, tais como saliva, leite materno, sémen e secreções vaginais. O fármaco é metabolizado, essencialmente, no fígado e é excretado na urina (Gardner & Hill, 2001).

O tinidazol, o ornidazol e o secnidazol apresentam semi-vidas mais longas do que o metronidazol, sendo mais adequados para uma administração única diária. Este facto é vantajoso no que respeita à adesão à terapêutica (Gardner & Hill, 2001).

O mecanismo de acção do metronidazol na *G. lamblia* tem sido o mais estudado de todos os 5-nitroimidazóis. Este fármaco utiliza as vias metabólicas anaeróbias do parasita, dependentes da enzima piruvato ferredoxina oxirreductase (PFOR). O metronidazol penetra no trofozoíto, e uma vez dentro da célula, as ferredoxinas (proteínas transportadoras de electrões) do parasita doam electrões ao grupo nitro do fármaco (Upcroft & Upcroft, 1998; Samuelson, 1999; Campanati & Monteiro-Leal, 2002). O fármaco é activado pela redução do seu grupo nitro (Upcroft & Upcroft, 1998; Samuelson, 1999; Campanati & Monteiro-Leal, 2002), e esta reacção de redução estabelece um gradiente que favorece o transporte intracelular do metronidazol. Depois de reduzida, a molécula do fármaco funciona como um terminal receptor de electrões que se liga de forma covalente a macromoléculas de ADN (Campanati & Monteiro-Leal, 2002). Isto danifica o ADN, através da perda da estrutura helicoidal, comprometimento da replicação, e quebras na cadeia, conduzindo à morte do trofozoíto, e inibindo ao mesmo tempo a respiração do trofozoíto (Gardner & Hill, 2001).

A redução do metronidazol também pode levar à formação de radicais tóxicos, que reagem com o ADN, o RNA e proteínas intracelulares (Freeman *et al.*, 1997; Upcroft & Upcroft, 1998; Campanati & Monteiro-Leal, 2002).

A toxicidade selectiva do metronidazol deve-se a propriedades bioquímicas dos microorganismos anaeróbios que não existem nas células aeróbias. O grupo nitro do metronidazol é reduzido através de vias metabólicas com baixo potencial redox exclusivas dos protozoários e bactérias anaeróbias (Upcroft & Upcroft, 1998).

Os efeitos secundários adversos mais frequentes incluem desconforto gastrointestinal, cefaleias, náuseas, leucopenia e um gosto metálico na boca. O metronidazol tem a capacidade de afectar o sistema nervoso, sendo necessária a monitorização dos pacientes devido ao risco de surgirem convulsões ou neuropatia periférica. Menos frequentemente podem ocorrer depressão, irritabilidade, agitação ou insónias (Martinez & Caumes, 2001).

O metronidazol tem sido descrito como carcinogénico, teratogénico e mutagénico, apesar de não estar clinicamente provado.

Apesar de ser utilizado no tratamento de crianças e adultos moderadamente afectados ou assintomáticos, as mulheres grávidas devem ser aconselhadas a não tomarem este fármaco durante o primeiro trimestre da gravidez devido aos seus potenciais efeitos adversos para o feto (Mineno & Avery, 2003).

Os mecanismos de resistência de *G. lamblia* e outros protozoários anaeróbios ainda não são completamente conhecidos. A resistência ao metronidazol induzida *in vitro* correlaciona-se com um decréscimo da actividade da PFOR, a enzima necessária para a sua activação (Campanati & Monteiro-Leal, 2002).

4.2. Tinidazol

Estudos *in vitro* revelaram que o tinidazol, também ele um derivado 5-nitroimidazol, apresenta superioridade quando comparado ao metronidazol (Jokipil & Jokipil, 1980; Gordts *et al.*, 1985) e à nitazoxanida (Ponce-Macotela *et al.*, 2001). Este fármaco pode ser utilizado em situações em que o tratamento com recurso ao metronidazol tenha falhado.

Evidências clínicas em pacientes adultos e pediátricos demonstram a sua eficácia e segurança no tratamento da giardiose. O regime mais comum é de 2g em pacientes adultos e 50mg/kg em doentes pediátricos, ambos numa dose única. A eficácia varia entre 72-100%, com uma eficácia média de cerca de 89% (Chan *et al.*, 1999; Pengsaa *et al.*, 1999; Escobedo *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2003; Cañete *et al.*, 2006; Escobedo *et al.*, 2007).

Comparativamente ao metronidazol, sintomas como diarreia melhoraram mais rápido recorrendo ao tinidazol (Gazder & Banerjee, 1978). Além disso, as taxas de cura da parasitose foram superiores (Jokipil & Jokipil, 1979; Gazder & Banerjee, 1978), ou semelhantes (Bassily *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1999), quando ambos os fármacos foram avaliados.

O tinidazol apresenta a vantagem de ser melhor tolerado que o metronidazol. Os efeitos secundários à utilização de tinidazol incluem gosto amargo, náuseas e urticária. Num estudo *in vitro* foi avaliado o potencial de dano genético e os resultados sugeriram um potencial efeito genotóxico e citotóxico (Lopez-Nigro *et al.*, 2001).

No que respeita à sua utilização em mulheres grávidas, foram realizados estudos em animais com administração de tinidazol via oral durante seis dias e não pareceu influenciar as taxas de malformação nem o desenvolvimento pós-natal da prole. No entanto, como precaução, as mulheres grávidas não devem ser tratadas com este fármaco.

4.3. Secnidazol

O secnidazol foi também considerado uma boa escolha para o tratamento da giardiose, tendo demonstrado bons resultados em estudos clínicos. Num estudo *in vitro*, as concentrações deste fármaco, que inibiram 50% do crescimento de *G. lamblia* (IC₅₀), foram menores do que as concentrações de furazolidona e metronidazol (Favennee & Gobert, 1992).

É bem absorvido pelo intestino e apresenta como vantagem o facto de possuir a semi-vida mais longa dos compostos 5-nitroimidazóis usados na giardiose, o que permite recomendar um regime de dose oral única.

Testes clínicos com crianças usaram doses únicas e a sua eficácia variou entre 79,4 e 98% (Di-Prisco *et al.*, 2000; Escobedo, *et al.*, 2003; Escobedo *et al.*, 2007). O regime mais comum é de 2g em pacientes adultos e de 30mg/kg em doentes pediátricos, ambos em dose única.

Apesar dos pacientes poderem tolerar razoavelmente bem um tratamento com secnidazol, foram identificados casos de sabor amargo, náuseas, vômitos, dores abdominais e outros efeitos moderados com esta medicação (Escobedo *et al.*, 2007).

4.4. Ornidazol

O ornidazol é um composto 5-nitroimidazólico que, à semelhança do secnidazol e do tinidazol, se apresenta como uma boa alternativa no tratamento da giardiose.

Administrado como uma dose única de 1 a 2g em doentes adultos, mostrou boa eficácia clínica (90-100%) (Bassily *et al.*, 1987; Jokipil & Jokipil, 1982). Num estudo realizado por Ozbilgin *et al.*, (2002), este fármaco foi administrado sob vários regimes de dose única de 30, 25 e 20mg/kg durante um dia e 25mg/kg diariamente durante cinco dias, tendo sido alcançadas taxas de cura de 97, 97, 94 e 100%, respectivamente. Todos foram significativamente mais eficazes do que o metronidazol (Ozbilgin *et al.*, 2002). Em pacientes pediátricos obtiveram-se excelentes resultados com 40 ou 50mg/kg. Num outro estudo realizado em adultos, foram administradas 500mg duas vezes ao dia, durante cinco dias, apresentando uma eficácia de 65%. O regime mais comum é 2g em doentes adultos e 40-50mg/kg em pacientes pediátricos, ambos numa dose única (Oren *et al.*, 1991; Bulut *et al.*, 1996).

Num estudo *in vitro* foram sugeridos efeitos genotóxicos e citotóxicos. Apesar de terem sido reportados três casos de hepatite e colangite associada em situações em que foi administrado ornidazol em doses convencionais (que melhoraram após um a dois meses da suspensão do tratamento), os efeitos secundários surgem raramente após administração oral deste fármaco (Lopez-Nigro *et al.*, 2003).

4.5. Quinacrina

Também conhecida como mepacrina e atabrina, a quinacrina é um substituto da acridina, estando disponível nos EUA desde meados de 1930 altura em que foi introduzida como antimalárico (Upcroft *et al.*, 1996a). Em 1941, foi recomendada a sua utilização no tratamento da giardiose (Wright *et al.*, 2003), sendo considerado o primeiro antiparasitário eficaz no tratamento desta parasitose, apresentando uma taxa de cura entre 92 e 95% (Wolfe, 1998; Mineno

& Avery, 2003), mantendo-se como único fármaco disponível até à introdução dos 5-nitroimidazóis (concretamente metronidazol).

Habitualmente, a susceptibilidade de *G. lamblia* à quinacrina, tanto *in vitro* como *in vivo*, é comparável à susceptibilidade ao metronidazol. Contudo, a quinacrina apresenta como vantagem o facto de também exercer actividade contra os quistos do parasita (Gillin & Diamond, 1981).

O mecanismo de acção da quinacrina ainda não é completamente esclarecido. Pensa-se que este fármaco exerce a sua acção através da ligação ao ADN do parasita (Mineno & Avery, 2003; Wright *et al.*, 2003), inibindo a síntese dos ácidos nucleicos (Harder & Haberkorn, 2001). Ensaio *in vitro*, permitiram verificar que este fármaco reduz a viabilidade dos quistos e as taxas de desenquistamento (Gardner & Hill, 2001).

A resistência à quinacrina em laboratório deve-se a um mecanismo ainda não compreendido em que ocorre exclusão activa do fármaco do parasita (Harris *et al.*, 2001).

Os efeitos secundários desta droga incluem tonturas, cefaleias, vômitos, náuseas, toxicidade ocular, febre, psicose tóxica, convulsões, estimulação do sistema nervoso central, coloração azul ou amarela da pele, pigmentação da retina, coloração da urina, gosto amargo (podendo reduzir a adesão à terapêutica), vertigens, prurido, insónias, hemólise nos pacientes com deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase e reacções do tipo dissulfiram se houver ingestão de álcool (Harris *et al.*, 2001; Mineno & Avery, 2003; Wright *et al.*, 2003; Escobedo & Cimerman, 2007).

Para além destes efeitos colaterais, a quinacrina está contra-indicada em indivíduos com psoríase, com psicose e em grávidas, uma vez que atravessa a barreira placentária (Mineno & Avery, 2003; Escobedo & Cimerman, 2007).

4.6. Furazolidona

Aprovada pela FDA em 1955 para o tratamento da diarreia e enterite bacteriana ou protozoária, a furazolidona é um anti-infeccioso derivado do nitrofurano, tendo sido descrito pela primeira vez como activo contra *G. lamblia* em 1960 e demonstrada a sua eficácia tanto *in vivo* como *in vitro*. É dos fármacos menos eficazes no tratamento da giardiose, apresentando taxas de cura que variam entre 80 e 89%. Contudo, tem ainda utilidade na prática clínica, especialmente em pediatria, uma vez que existe uma formulação líquida que facilita a sua administração em crianças (Minero & Avery, 2003; Escobedo & Cimerman, 2007).

O mecanismo de acção da furazolidona contra *G. lamblia* ainda não está completamente esclarecido. É provável que seja reduzido a radicais nitro tóxicos no interior dos trofozoítos, por uma NADH oxidase (Brown *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Gardner & Hill, 2001). A forma reduzida do fármaco irá depois interagir com os componentes celulares do parasita, incluindo o ADN (Harris *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007). Num estudo foi demonstrado que a furazolidona actua nas fases S, G₂ e M do ciclo celular inibindo a síntese de ADN e a realização do ciclo celular (Harris *et al.*, 2001). A sua toxicidade selectiva é estabelecida pela pouca absorção no intestino e pelo facto de ser apenas activada pelo parasita (Wright *et al.*, 2003).

Os principais efeitos adversos da furazolidona incluem, distúrbios gastrointestinais, anemia hemolítica, reacções do tipo dissulfiram ao álcool, reacções de hipersensibilidade e pigmentação castanha da urina (Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007). Ainda que com menos frequência, podem ocorrer hipotensão ortostática e hipoglicemia (Minero & Avery, 2003). Estudos demonstraram também a sua carcinogenicidade em roedores e mutagenicidade em bactérias (Harris *et al.*, 2001; Minero & Avery, 2003).

A furazolidona está contra-indicada na gravidez devido aos seus prováveis efeitos adversos, sendo preferível iniciar o tratamento depois do parto. Não se recomenda igualmente a sua utilização em bebés com menos de um mês de idade devido ao risco de desenvolverem anemia hemolítica (Gardner & Hill, 2001).

Este fármaco partilha semelhanças estruturais e funcionais com os inibidores da monoamina oxidase (MAO), apresentando portanto actividade inibidora da MAO. Deste modo, a furazolidona não deve ser administrado em pacientes que estejam medicados com inibidores da MAO (Minero & Avery, 2003; Escobedo & Cimerman, 2007).

É necessário atender ao facto deste fármaco poder desencadear crises hipertensivas, quando associado a determinados alimentos contendo tiramina (Harris *et al.*, 2001).

A furazolidona pode ser uma alternativa ao metronidazol em situações de resistência àquele fármaco (Minero & Avery, 2003), tendo-se mostrado eficiente na diminuição de produção de quistos *in vitro* (Hausen *et al.*, 2006), assim como na diminuição da proliferação de trofozoítos *in vitro* (Campanati & Monteiro-Leal, 2002).

4.7. Paromomicina

A paromomicina é um aminoglicosídeo isolado pela primeira vez em 1956 e está indicada no tratamento da *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas*, tendo sido proposta para o tratamento de *G. lamblia*, particularmente em infecções resistentes e em mulheres grávidas. Esta opção terapêutica deve-se ao facto de ser um fármaco fracamente absorvido, apresentando uma baixa toxicidade e não estar associado a efeitos teratogénicos (Ortega & Adam, 1997; Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001).

Apesar das experiências clínicas com este fármaco no tratamento da Giardiose serem ainda limitadas (Nash, 2001), alguns testes *in vitro* demonstraram que a paromomicina é activa contra *G. lamblia*. Contudo, os mesmos estudos mostraram que este fármaco apresenta uma actividade inferior à do metronidazol, quinacrina e furazolidona (Gordts *et al.*, 1985). A sua pouca actividade antiprotozoária é, no entanto, compensada pelos elevados níveis que atinge ao nível do intestino, ocasionados pela sua baixa absorção.

A paromomicina é excretada nas fezes praticamente sem sofrer metabolização (Escobedo & Cimerman, 2007). A eficácia deste fármaco na giardiose varia entre 60 e 70% (Mineno & Avery, 2003).

A paromomicina actua por inibição da síntese proteica de *G. lamblia*, interferindo com as subunidades 50S e 30S dos ribossomas, o que provoca erros na leitura dos codões de RNA mensageiro (Gardner & Hill, 2001)

Os seus principais efeitos adversos incluem náuseas, dor abdominal e diarreia (Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Mineno & Avery, 2003; Escobedo & Cimerman, 2007). Tal como se verifica com outros aminoglicosídeos, a sua absorção sistémica pode provocar nefrotoxicidade e ototoxicidade.

A nefrotoxicidade não deve afectar os pacientes com função renal normal, tendo em conta a sua absorção sistémica limitada. Contudo, este fármaco deve ser utilizado com precaução em doentes com insuficiência renal (Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Mineno & Avery, 2003). No que respeita à ototoxicidade, a paromomicina parece apresentar menor toxicidade que os restantes aminoglicosídeos (Gardner & Hill, 2001).

4.8. Albendazol

O albendazol é um derivado benzimidazólico, que surgiu em 1982 como anti-helmíntico (Mineno & Avery, 2003). Estudos recentes demonstraram que os benzimidazóis, tal como o albendazol, o mebendazol, o flubendazol e o fenbendazol inibem o desenvolvimento *in vitro* da *Trichomonas vaginalis* (Valdez *et al.*, 2002) e de *G. lamblia* (Escobedo *et al.*, 2003; Alizadeh *et al.*, 2006).

A eficácia no tratamento da giardiose com albendazol, mebendazol e fenbendazol também tem sido observada em animais tais como gado bovino, cães e ratos (Meyer, 1998; Reynoldson *et al.*, 1991; Mineno & Avery, 2003).

Com uma eficácia terapêutica semelhante ao metronidazol, o albendazol é considerado uma boa alternativa ao tratamento da giardiose (Valdez *et al.*, 2002; Navarrete-Vásquez *et al.*, 2003). No entanto, para obter níveis semelhantes de eficácia, o albendazol necessita de tratamentos mais prolongados, comparativamente ao metronidazol, sendo uma desvantagem para a adesão à

terapêutica (Mineno & Avery, 2003). As suas vantagens, relativamente ao metronidazol, passam por não provocar anorexia em crianças, ter um espectro de acção alargado (podendo ser utilizado em pacientes infectados com vários parasitas intestinais) e estar disponível numa suspensão oral, o que pode ser vantajoso em pediatria (Mineno & Avery, 2003).

A absorção do albendazol no tracto gastrointestinal é baixa devido à sua fraca solubilidade aquosa. No entanto, pode ser aumentada se for administrada concomitantemente com uma refeição rica em gorduras (Mineno & Avery, 2003).

A actividade do albendazol deve-se ao albendazol sulfóxido, o seu metabolito primário, que é instantaneamente formado no fígado após a absorção (Gardner & Hill, 2001). De seguida, é rapidamente oxidado originando a albendazol sulfona, um metabolito inactivo. A baixa absorção e o rápido e extenso metabolismo no fígado parecem justificar as diferenças na eficácia *in vitro* e *in vivo* (Wright *et al.*, 2003). Em estudos *in vitro*, o albendazol mostrou ser cerca de 56 vezes superior ao metronidazol (Cruz *et al.*, 2003), contrastando com os relatos de falhas nos tratamentos com albendazol (Upcroft & Upcroft, 2001).

Os benzimidazóis, como o albendazol, exercem o seu efeito ligando-se aos monómeros de β -tubulina (MacDonald *et al.*, 2004) e/ou giardinas do parasita, inibindo a polimerização dos microtúbulos do citoesqueleto dos trofozoítos (Mineno & Avery, 2003) e comprometendo também a absorção de glicose (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2004). Isto paralisa o parasita e leva à sua excreção (Mineno & Avery, 2003). A exposição de *G. lamblia* ao albendazol não diminui a sua actividade flagelar, indicando que o fármaco tem um efeito selectivo nas tubulinas do disco central ou nas giardinas associadas (Edlind *et al.*, 1990; Meloni *et al.*, 1990; Oxberry *et al.*, 1994).

A toxicidade selectiva deve-se a uma maior afinidade dos benzimidazóis pela tubulina do parasita do que pela tubulina do hospedeiro (Valdez *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2004).

A resistência de *G. lamblia* ao albendazol já foi induzida *in vitro* (Lindquist, 1996) e está relacionada com modificações no citoesqueleto do parasita (Upcroft *et al.*, 1996b). Tendo em conta que todos os fármacos deste grupo partilham o

mesmo local de acção, eles exibem resistência cruzada (Navarrete-Vásquez *et al.*, 2001).

Os efeitos adversos do albendazol incluem distúrbios gastrointestinais, dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, vertigens, tonturas, febre, aumento da pressão intracraniana e alopecia (Escobedo & Cimerman, 2007).

Após uso prolongado foi observada elevação reversível das transaminases hepáticas em 15% dos pacientes. Contudo, geralmente não é necessário descontinuar o fármaco tendo em conta que os efeitos adversos tendem a ser poucos e moderados. No que se refere à administração durante a gravidez, este fármaco está contra-indicado pelo facto de possuir características teratogénicas (Mineno & Avery, 2003).

4.9. Nitazoxanida

Sintetizada pela primeira vez em 1976 por Rossignol & Cavier, a nitazoxanida é um derivado do 5-nitrotiazol, tendo sido utilizado como antiparasitário, uma vez que apresenta uma estrutura semelhante às nitrobenzamidias. A recente demonstração da actividade da nitazoxanida na criptosporidiose e a sua actividade *in vitro* contra outros protozoários intestinais foi um grande impulso na terapia farmacológica destas parasitoses (Petri, 2003).

O seu espectro de actividade é alargado, demonstrando eficácia contra protozoários (*Cryptosporidium parvum*, *G. lamblia*, *Isospora belli*, *Entamoeba histolytica*), helmintas (*Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Fasciola hepatica*), e contra bactérias anaeróbias e microaerofílicas (*Helicobacter pylori*), tanto em adultos como em crianças (Adagu *et al.*, 2002).

Em França, este fármaco foi utilizado com sucesso para tratar um paciente infectado com SIDA e com giardiose resistente ao metronidazol e ao albendazol (Abboud *et al.*, 2001), surgindo por isso como uma alternativa para o tratamento de infecções de Giardiose resistentes (Dumbo *et al.*, 1997; Romero Cabello *et al.*, 1998; Abboud *et al.*, 2001; Ortiz *et al.*, 2001; Rossignol *et al.*, 2001; Cohen, 2005).

Aprovado para o tratamento de diarreia causada por *G. lamblia* em crianças com idades compreendidas entre 1 e 11 anos, estudos *in vitro*, demonstraram que a nitazoxanida e o seu metabolito activo, tizoxanida, parecem ser oito vezes mais activos do que o metronidazol (Adagu *et al.*, 2002; Cedillo-Rivera *et al.*, 2002).

Outros estudos sugerem a nitazoxanida como um fármaco tão eficaz como o metronidazol (Abboud *et al.*, 2001; Anon, 2003) e tão eficaz como o mebendazol no tratamento da Giardiose (Rodriguez Garcia *et al.*, 1999).

Dados clínicos revelam que a nitazoxanida é bem tolerada e eficaz, apresentando taxas de cura entre 70 e 90% (Adagu *et al.*, 2002; Abboud *et al.*, 2001; Rossignol *et al.*, 2001).

Um estudo realizado por Ortiz *et al.* (2001) descreve também a nitazoxanida como um fármaco seguro e eficaz no tratamento da giardiose em crianças, apresentando uma taxa de eficácia de cerca de 85%.

O seu mecanismo de acção ainda não está completamente esclarecido, mas parece resultar da interferência do fármaco na reacção de transferência de electrões dependente da enzima PFOR (piruvato ferredoxina oxidoreductase), reacção essencial para o metabolismo energético anaeróbio (Dunne, *et al.*, 2003; Cohen, 2005). Estudos demonstraram que a PFOR de *G. lamblia* reduz a nitazoxanida através de uma transferência de electrões na ausência de ferredoxina (Cohen, 2005).

Após a administração oral, a nitazoxanida não é detectada no plasma, pois é rapidamente hidrolisada para o seu metabolito activo tizoxanida (desacetil-nitazoxanida), que vai posteriormente sofrer uma reacção de glucuronidação. A tizoxanida é excretada na urina e nas fezes (Broekhuysen *et al.*, 2000).

Este fármaco é, de uma forma geral bem tolerado, sendo os seus efeitos adversos mais comuns, dores abdominais, diarreia, vómitos e cefaleias (Cohen, 2005; Escobedo & Cimerman, 2007).

5. Falência da Terapêutica

Apesar de terem recebido vários regimes terapêuticos que resultam em cura para a maioria dos pacientes, alguns indivíduos não respondem aos tratamentos (Nash *et al.*, 2001). O insucesso da terapêutica sem razão aparente conhecida tem sido descrito com todos os fármacos frequentemente utilizados contra *G. lamblia* (Gardner & Hill, 2001). Situações refractárias no tratamento da Giardiose são também registadas com mais frequência (Mendelson, 1980; Gordts *et al.*, 1985; Boreham *et al.*, 1988a; Kollaritsch *et al.*, 1993; Brasseur & Favennec, 1995; Argüello-García *et al.*, 2004).

As poucas alternativas terapêuticas, os tratamentos desadequados e/ou o aparecimento de casos de resistência são apontados como os principais motivos (Argüello-García *et al.*, 2004; McIntyre *et al.*, 1986; Meloni *et al.*, 1990; Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001). Além disso, podem também ocorrer devido a reinfecções, situações de imunossupressão (Nash *et al.*, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007), ou outras razões desconhecidas.

Em situações clínicas normais, a presença de reinfecção pode ser facilmente determinada. Ainda assim, em áreas muito endémicas, pode ser complicado diferenciar situações de falência terapêutica (devido por exemplo ao desenvolvimento de resistência) e uma reinfecção. A distinção torna-se especialmente difícil quando o intervalo entre o tratamento e a realização de análises é considerável, particularmente em regiões onde existe um elevado risco de transmissão (Escobedo & Cimerman, 2007).

A reinfecção ocorre com frequência em regiões em que o parasita é altamente endémico e a contaminação ambiental é elevada e também onde existam más condições de higiene oral-fecal (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001). Nos países desenvolvidos, onde a prevalência da infecção é baixa e a exposição a *G. lamblia* não é tão frequente, a reinfecção raramente é motivo do insucesso do tratamento (Nash *et al.*, 2001). No caso de um doente ser novamente infectado por este parasita, e portanto tratar-se de uma reinfecção, um segundo tratamento com o mesmo fármaco pode ser uma boa opção terapêutica (Escobedo & Cimerman, 2007).

Nas situações referidas, a identificação dos factores de risco é importante e o paciente deve ser aconselhado relativamente a medidas de higiene e preventivas (Gardner & Hill, 2001).

Outra situação que pode justificar a falência de tratamentos pode ser a coinfeção com outros agentes biológicos entéricos, constituindo a maior causa de queixas de distúrbios gastrointestinais. Infecções coincidentes com outros organismos podem estar presentes nos mesmos doentes, sem contudo ser detectadas por se utilizar apenas um método de diagnóstico. Os doentes que não melhoram com o tratamento devem ser observados para analisar se se trata de uma infecção persistente, mas também para avaliar a presença de outros agentes patogénicos, que podem ou não partilhar o mesmo modo de transmissão (Escobedo & Cimerman, 2007).

Alguns pacientes imunocomprometidos, como é o caso de doentes que apresentam hipogamaglobulinemia ou doenças linfoproliferativas que envolvam o tracto gastrointestinal, parecem ser anormalmente susceptíveis a *G. lamblia* e as suas infecções são difíceis de tratar. Os doentes com SIDA são, normalmente, tratados com sucesso recorrendo aos fármacos anti-giardiais habituais. Foram no entanto relatados casos graves de giardiose, que não respondem às terapias, o que pode representar risco de vida para o doente (Aronson *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001). Nestes pacientes o sucesso da terapêutica pode passar por um aumento da dosagem do fármaco, pela troca por outro fármaco ou pela combinação terapêutica de fármacos (Abboud *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001).

Um dos principais motivos apontados para justificar o insucesso do tratamento da giardiose prende-se sobretudo ao desenvolvimento de resistência pelo parasita aos antiparasitários habitualmente prescritos (Lemeé *et al.*, 2000). De facto, actualmente, o aumento considerável de agentes infecciosos resistentes aos fármacos tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública e uma das maiores barreiras para o controlo das parasitoses intestinais (Sangster *et al.*, 2002).

A definição de resistência aos fármacos foi estabelecida em 1973 pela OMS como "a capacidade de um parasita sobreviver e/ou reproduzir-se apesar da administração e absorção de um fármaco em doses iguais ou superiores às recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância do indivíduo" (Basco *et al.*, 2000; Mineno & Avery, 2003).

A resistência aos fármacos pode surgir através de diferentes mecanismos incluindo: modificação no alvo molecular, de forma que o fármaco não reconhece o seu alvo tornando-se inactivo; alteração nas vias metabólicas que activam, inactivam ou eliminam o fármaco; modificação na distribuição do fármaco no organismo alvo, impedindo o fármaco de atingir o seu local de acção e amplificação genética do alvo excedendo a acção do fármaco (Wolstenholme *et al.*, 2004).

Apesar de terem sido já identificados casos de resistência para a maioria dos fármacos anti-giardiais actualmente utilizados (Upcroft & Upcroft, 2001), a falência do tratamento tem sido atribuído essencialmente à resistência aos nitroimidazóis (Lemée *et al.*, 2000; Abboud *et al.*, 2001). Existem também casos relatados de desenvolvimento de resistência ao albendazol, à quinacrina e à furazolidona (Lindquist, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001). Situações acontecem em que, isolados parecem ser resistentes clinicamente tendo contudo mostrado susceptibilidade *in vitro* e vice-versa.

A prevalência de casos de resistência ao metronidazol atinge cerca de 20% das situações (Farthing, 1996), com taxas de recorrência até 90% (Zaat *et al.*, 1997). Os organismos resistentes foram isolados a partir de pacientes e caracterizados em diversos laboratórios (Upcroft & Upcroft, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Adam, 2001; Adagu *et al.*, 2002; Jimenez-Cardoso *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2004). A resistência cruzada ao tinidazol foi demonstrada em estirpes resistentes ao metronidazol (Upcroft & Upcroft, 2001). Além disso, estudos revelaram que isolados resistentes à furazolidona, por indução *in vitro*, se tornam mais rapidamente resistentes à quinacrina (Upcroft *et al.*, 1996) e que a resistência ao albendazol pode ocorrer mais facilmente em isolados de *G. lamblia* resistentes ao metronidazol e à furazolidona. Estes fenótipos são considerados como multiresistentes.

Pela frequência com que ocorrem e pela importância que assumem na falência terapêutica, a resistência dos microorganismos aos fármacos é actualmente um sério desafio, tornando-se a preservação das estratégias terapêuticas uma prioridade.

As estirpes clinicamente resistentes têm sido tratadas com doses mais elevadas, ou tratamentos mais prolongados do fármaco usado originalmente, ou uma combinação de ambos. Outra estratégia apontada é a utilização de outro agente anti-giardial com um mecanismo de acção diferente. As combinações de fármacos existentes parecem ser uma boa forma de manter a eficácia dos tratamentos (Gardner & Hill, 2001; Nash *et al.*, 2001).

Clinicamente, a quinacrina em associação com um derivado 5-nitroimidazólico, como o metronidazol (Nash *et al.*, 2001), oferece, enquanto combinação terapêutica, a possibilidade de atacar o parasita através de dois mecanismos de acção em simultâneo. Outras terapias combinadas têm sido usadas com sucesso em pacientes nos quais as terapêuticas convencionais (metronidazol, furazolidona e quinacrina) falharam. Destaca-se a associação do metronidazol e propranolol (Gardner & Hill, 2001), e do metronidazol e albendazol (Hanevik *et al.*, 2008). Estas associações permitem evitar resistência cruzada, desde que os genes responsáveis pela resistência sejam diferentes (Gardner & Hill, 2001).

O conhecimento dos mecanismos de resistência dos parasitas aos fármacos é importante para prevenir ou limitar a sua ocorrência. Partindo do conhecimento dos mecanismos a nível molecular é possível introduzir modificações nos fármacos já existentes. Os conhecimentos que a sequenciação do genoma de *G. lamblia* pode trazer sobre as vias metabólicas do parasita também oferecem grandes promessas para o desenvolvimento de novos fármacos (Petri, 2003). Na *G. lamblia* a via metabólica da arginina dihidrolase, as proteínas de superfície ricas em cisteína e as giardinas são potenciais alvos terapêuticos (Upcroft & Upcroft, 1993).

6. Considerações Finais

Pela sua elevada frequência em todo mundo, estudos envolvendo *G. lamblia* assumem uma grande importância na actualidade. Este parasita é considerado o protozoário patogénico mais comum no intestino do Homem (Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006; Ali & Nozaki, 2007).

Além do Homem, vários estudos têm demonstrado a presença de *G. lamblia* numa grande variedade de outros mamíferos. Este facto assume maior importância uma vez que levanta a possibilidade de transmissão entre diferentes espécies levando a que seja considerado um agente zoonótico (Thompson, 2004; O'Handley *et al.*, 2006; Batchelor *et al.*, 2008).

A giardiose é especialmente prevalente em países em desenvolvimento, onde existem más condições sanitárias ou em estações de tratamento de água com funcionamento deficiente, sendo as crianças as principais afectadas (Adam, 1991; Crompton & Savioli, 1993; 241; Ali & Nozaki, 2007).

A transmissão de *G. lamblia* ocorre, essencialmente através da ingestão de águas ou alimentos contaminados com cistos deste parasita *ou* por contaminação fecal-oral directa (Barwick *et al.*, 2000; Adam, 2001; Petri, 2003; Cruz *et al.*, 2003; Pozio E., 2008). Sendo a Giardiose uma zoonose, vários animais contribuem para contaminação ambiental. A transmissão indirecta através da água tem sido a forma mais comum de disseminação do parasita, tornando-se por este motivo indispensável um tratamento adequado da água como forma de controlar esta parasitose.

O grau de infecção é determinado por factores relacionados com o parasita e com o hospedeiro, sendo que neste ultimo caso, os principais factores incluem a imunidade, o estado nutricional e as infecções. Relativamente às estirpes destacam-se a sua virulência e patogenicidade (Thompson, *et al.*, 1993)

Apesar de muitos indivíduos infectados por *G. lamblia* permanecerem assintomáticos, esta parasitose é caracterizada por quadros clínicos que incluem náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreias graves e mal-absorção que pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento.

A sintomatologia associada assume especial importância em pessoas desnutridas, com imunodeficiências, com fibrose quística e especialmente na idade pediátrica, pela sua maior prevalência nesta faixa etária e pelas interferências que pode vir a ter no crescimento.

Cada vez mais existe uma maior sensibilização para esta problemática, passando o controlo desta parasitose intestinal por uma melhoria das condições higieno-sanitárias das populações, por alterações nos hábitos higieno-sanitários e aplicação de medidas terapêuticas adequadas que permitam aliviar os sintomas, prevenir o desenvolvimento da doença crónica e, especialmente, eliminar a parasitose (Cruz *et al.*, 2003b).

Com o aparecimento de casos de resistência, a decisão da melhor terapêutica a implementar numa situação de giardiose continua a ser um grande desafio, tornando-se difícil encontrar um consenso quanto ao agente anti-giardial mais adequado para estes casos clínicos.

Devem ser desenvolvidos planos de tratamento personalizados de acordo com o cenário clínico e epidemiológico. A selecção do fármaco a administrar no tratamento desta infecção deve ter em conta vários aspectos incluindo a prevalência na comunidade, idade do paciente, presença de sintomas e outras comorbilidades no hospedeiro. A disponibilidade e facilidade de administração dos fármacos anti-giardiais, a possibilidade de existir uma gravidez, uma co-infecção com outros parasitas intestinais, a eficácia clínica e parasitológica e os efeitos adversos, são outros dos aspectos a considerar. Os pacientes assintomáticos requerem uma abordagem cautelosa da sua situação clínica, uma vez que nem sempre necessitam de tratamento (Gardner & Hill, 2001; Escobedo & Cimerman, 2007).

Os fármacos de dose única seguros e eficazes como alguns 5-nitroimidazóis de longa duração, incluindo o tinidazol ou o ornidazol, apresentam-se como uma boa alternativa, tendo em conta o número considerável de estudos clínicos realizados e que apontam para a boa tolerância destes fármacos, com elevadas taxas de eficácia clínica e em que as dosagens necessárias facilitam a adesão ao tratamento, o que contribui para o sucesso da terapêutica.

São também consideradas terapêuticas eficazes em situações de giardiose a administração de cinco a sete dias de quinacrina ou de metronidazol. A furazolidona é também uma alternativa eficaz mas requer sete a dez dias de tratamento, quatro vezes por dia, o que provavelmente afectará a tolerância.

Por não se encontrarem disponíveis em muitos países, a prescrição de fármacos como o tinidazol e o ornizadol ocorre com menor frequência. A produção de quinacrina foi descontinuada em muitos locais, talvez pelo facto de estar associada significativos efeitos adversos, particularmente nas crianças.

Assim, e no seguimento do exposto, actualmente o fármaco frequentemente utilizado no tratamento da giardiose, tanto para os adultos como para crianças, continua a ser o metronidazol, com uma taxa de eficácia a rondar os 90%. Contudo, as altas dosagens e o tratamento prolongado e desagradável diminui a tolerância e podem aumentar os efeitos adversos. Além disso este fármaco não se encontra indicado para a giardiose pela Food and Drug Administration (FDA).

Nas terapêuticas mais recentes, o albendazol num regime de cinco dias parece ser promissor. Apresenta como principal vantagem o facto de ter um efeito antiparasitário mais alargado, o que pode ser benéfico em cenários como os países em vias de desenvolvimento, onde esta parasitose é mais prevalente.

Actualmente, as perspectivas para o tratamento da giardiose estão a melhorar, não só com a actividade reconhecida dos benzimidazóis (onde se inclui o albendazol), mas também com a recente inclusão de novos fármacos (como a nitazoxanida) e a proposta de associações terapêuticas. No entanto, devem ser avaliadas outras terapias combinadas no sentido de descobrir formas mais eficazes de associar agentes anti-giardiais, sem com isso aumentar os efeitos adversos.

Na gravidez, se for necessário tratamento, deve-se optar pela paramomicina no primeiro trimestre e paramomicina ou metronidazol no segundo e terceiro trimestres.

Após tratamento farmacológico, pode ser esperado que os parasitas sejam eliminados através das fezes em três a cinco dias e que os sintomas desapareçam em cinco a sete dias (91, 100, 131, 171). No caso dos sintomas não desaparecerem, o doente deve ser avaliado por falência terapêutica.

As situações de falência terapêutica podem estar associadas a diferentes causas passando essencialmente pelo recurso a esquemas terapêuticos inadequados, imunossupressão e reinfecção. Contudo, o principal motivo deve-se à resistência que os organismos desenvolvem aos fármacos (Cruz *et al.*, 2003b; Nash *et al.*, 2001). Nesta situação uma terapêutica com um fármaco que tenha mecanismo de acção diferente ou uma associação de fármacos poderá ser uma boa opção.

Com relatos cada vez mais frequentes de insucessos com os fármacos habitualmente prescritos, a investigação de estratégias terapêuticas para o tratamento da giardiose será potencialmente uma área a desenvolver no futuro.

Em conclusão, apesar dos derivados 5-nitroimidazóis continuarem a ser uma ferramenta importante para o tratamento desta parasitose na maioria dos pacientes, em alguns deles ocorre falência terapêutica. Neste sentido torna-se pertinente a realização de trabalhos de revisão relativamente às terapêuticas implementadas para esta parasitose bem como a realização de estudos que permitam avaliar a existência de resistências por forma a implementar uma terapêutica eficaz, contribuindo para o uso racional de medicamentos (Gardner & Hill, 2001).

7. Referências Bibliográficas

Abboud, P., Lemée V., Gargala G., Brasseur P., Ballet J. J., Borsa-Lebas F., Caron F. & Favennec L. 2001. Successful treatment of Metronidazol-and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.

Adagu, I. S., Nolder, D., Warhurst, D. C. & Rossignol. J. F. 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother.* **49(1)**:103-11.

Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Rev.* **55**:706-732.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.

Ali, V. & Nozaki, T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* **20(1)**:164-87.

Alizadeh, A., Ranjbar, M., Kashani, K. M., Taheri, M. M. & Bodaghi, M. 2006. Albendazole versus metronidazole in the treatment of patients with giardiasis in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J.* **12 (5)**: 548 - 54

Anon. 2003. Nitazoxanide – a new anti-protozoal agent. *Med. Lett. Drugs Ther.* **45**:29-31.

Arguello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres, G. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.

Armengol, C., Astolfi, C., Ontiveros, J., Benitez, D., Alvarez, M. & Serrano, C. 1997. Epidemiologia del Parasitismo intestinal infantil en el valle del Guadalquivir. *Rev. Esp. Salud Publica.* **71**:547-552.

Aronson, N. E., Cheney, C., Rholl, V., Burris, D. & Hadro, N. 2001. Biliary giardiasis in a patient with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Gastroenterol.* **33**:167-170.

Barwick, R. S., Levy, D. A., Craun, G. F., Beach, M. J., Calderon, R. L. 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1997-1998. *MMWR CDC Surveill Summ.* **49(4)**:1-21.

Basco, L. & Ringwald, P. 2000. Drug-resistant malaria: problems with its definition and technical approaches. *Sante.* **10**:47-50.

Bassily, S., Farid, Z., El-Masry, N. A. & Mikhail, E. M. 1987. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. *J Trop Med Hyg.* **90(1)**:9-12.

Batchelor, D. J., Tzannes, S., Graham, P. A., Wastling, J. M., Pinchbeck, G. L. & German, A. J. 2008. Detection of endoparasites with zoonotic potential in ogs with gastrointestinal disease in the UK. *Transbound Emerg Dis.* **55(2)**:99-104.

Bingham, A., Jarrill, E. & Meyer, E. 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation *in vitro* and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47**:284-291.

Bingham, A. & E. Meyer. 1979. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acid solutions. *Nature.* **277**:301-302.

Boreham, P. F. L., Phillips, R. E. & Shepherd, R. W. 1985. A comparison of the *in-vitro* activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **16**: 589-595.

Boreham, P. F. L., Smith, N. C. & Shepherd, R. W. 1988a. Drug resistance and the treatment of giardiasis. *In Advances in Giardia Research.* 3-7.

Brasseur, P. & Favennec, L. 1995. Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. *Parasite.* **2**:422-424.

Broekhuysen J., Stockis, A., Lins, R. L., De Graeve, J., Rossignol J. F. 2000. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **38 (8)**: 387–394.

Brown, D. M., Upcroft, J. A., Edwards, M. R. & Upcroft, P. 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**:155-161.

Bulut, B. U.; Gülnar, S. B. & Aysev, D. 1996. Alternative treatment protocols in giardiasis: a pilot study. *Scand J Infect Dis.* **28(5)**:493-5.

Cabral, M., Sousa, I., Miranda, A., Martins, M. & Sousa, J. C. 1991. Diagnóstico parasitológico de fezes em crianças de quatro infantários do Porto. *3º Congresso de Ciências Farmacêuticas e 1º Congresso de Farmacêuticos de Expressão Portuguesa.* Lisboa.

Cacciò, S. M.; Thompson, R. C.; McLauchlin, J. & Smith, H. V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* **21(9)**:430-437.

Campanati, L. & Monteiro-Leal, L. H. 2002. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitol Res.* **88**: 80–85.

Cañete, R., Escobedo, A. A., González, M. E., Almirall, P., Cantelar, N. 2006. A randomized, controlled, open-label trial of a single day of mebendazole versus a single dose of tinidazole in the treatment of giardiasis in children. *Curr Med Res Opin.* **22(11)**: 2139-6.

Castro, H. 2001. Giardíase: considerações práticas. *Rev. Port. Clin. Geral* **17**:57-61.

Cedillo-Rivera, R., J. Enciso-Moreno, A. Martinez-Palomo, & G. Pierres. 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Méd.* **22**:79-85.

Chan-Del-Pino, M.; Cornejo, I. C. & Rivera, I. T. 1999. Comparación de Albendazol con nitrofuranos y nitroimidazoles en el tratamiento de giardiasis en niños. *Revista de Gastroenterología del peru.* **19 (2)**: 95-108.

Cohen, S. A. 2005. Use of Nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: a pediatric perspective. *Current Medical Research and Opinion.* **21**:999-1004.

Crompton, D. W. & Savioli, L. 1993. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull. World Health Organ.* **71**:1-7.241-

Rosenblatt, J. E. 1992. Antiparasitic Agents. *Mayo Clin Proc* **67**:276-287.

Crompton, D. W. & Savioli, L. 1993. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bull World Health Organ.* **71(1)**:1-7.

Crouch, W. Seow, K. & Thong, Y. H. 1986. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **80**: 893-896.

Cruz, A., Cabral, M., Sousa, M. I. & Azeredo, Z. 2002. Parasitoses intestinais. Estudo transversal em crianças de escolas do 1º ciclo da cidade do Porto. *Arq. Med.* **16**: 211-218.

Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Leite, E., Sousa, J. C. F. & Cabral, M. 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.

Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Silva, M. C., Sousa, J. C. F., Manso, O. & Cabral, M. 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.

Di Prisco, M. C., Jiménez, J. C., Rodríguez, N., Costa, V., Villamizar, J., Silvera, A., Carrillo, M., Lira, C., Zerpa, E. & López, Y. 2000. Clinical trial with Secnidazole in a single dose in Venezuelan children infected by *Giardia intestinalis*. *Invest Clin.* **41(3)**:179-88.

- Doumbo, O., Rossignol, J. F., Pichard, E., Traore, H. A., Dembele, T. M., Diakite, M., Traore, F. & Diallo, D. A.** 1997. Nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhea and other intestinal parasitic infections associated with acquired immunodeficiency syndrome in tropical Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56(6)**:637-639.
- Dunne, R. L., Dunn, L. A. & Upcroft, P.** 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res.* **13**:239-249.
- Edlind, T. D., Hang, T. & Chakraborty, P.** 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162**:1408-1411.
- Enekwechi, L. C. & Azubike, C. N.** 1994. Survey of the prevalence of intestinal parasites in children of primary school age. *West Afr. J. Med.* **13**:227-230.
- Escobedo, A. A. & Cimerman, S.** 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother.* **8(12)**:1885-902.
- Escobedo, A. A., Cañete, R. & Núñez, F. A.** 2007. Intestinal protozoan and helminth infections in the Municipality San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba. *Trop Doct.* **37(4)**:236-8.
- Escobedo, A. A., Cañete, R., Gonzalez, M. E., Pareja, A., Cimerman, S. & Almirall, P.** 2003. A randomized trial comparing mebendazole and secnidazole for the treatment of giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol.* **97(5)**:499-504.
- Farthing, M.** 1996. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25**:493-515.
- Favennec, L., Chochillon, C., Magne, D., Meillet, D., Raichvarg, D., Savel, J. & Gobert, J. G.** 1992. A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cells. *Parasitol Res.* **78(1)**:80-1.
- Freeman, C. D., Klutman, N. E. & Lamp, K. C.** 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* **54**:679-409.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R.** 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.
- Gazder, A. J. & Banerjee, M.** 1978. Single dose therapy of giardiasis with tinidazole and metronidazole. *Drugs.* **15 Suppl 1**:30-2.
- Gillin, F. D. & Diamond, L.** 1981. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by metronidazole, quinacrine, and other antimicrobial agents. *JAC.* **8**:305-316.
- Gillin, F. D. & Reiner, D. S.** 1982. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Mol Cell Biol.* **2(4)**:369-77.

Gillin, F. D., Reiner, D. S. & McCaffery, J. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:679-705.

Gillin, F. D., Boucher, S. E., Rossi, S. S. & Reiner, D. S. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **69**:164-174.

Gordts, B., Hemelhof, W., Asselman, C. & Butzler, J. P. 1985. In vitro susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **28(3)**:378-380.

Hanevik, K., Morch, K., Eide, G. E., Langeland, N., Hausken, T. 2008. Effects of albendazole/metronidazole or tetracycline/folate treatments on persisting symptoms after *Giardia* infection: a randomized open clinical trial. *Scand J Infect Dis.***40(6-7)**:517-22.

Harder, A., Greif, G. & Haberkorn, A. 2001. Chemotherapeutic approaches to protozoa: *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba*--current level of knowledge and outlook. *Parasitol Res.* **87(9)**:785-6.

Harris, J. C., Plummer, S. & Lloyd, D. 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.

Hausen, M. A.; Freitas, J. C. Jr. & Monteiro-Leal, L. H. 2006. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol.* **113(3)**:135-41.

Howard, S. C., Donnell, C. A. & Chan, M. S. 2001. Methods for estimation of associations between multiple species parasite infections. *Parasitology* **122(Pt2)**:233-251.

Ighogboja, I. S. & Ikeh, E. I. 1997. Parasitic agents in childhood diarrhoea and malnutrition. *West Afr. J. Med.* **16**:36-39.

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. 2008. [Online]. <http://www.infarmed.pt>.(último acesso em 2008).

Jiménez-Cardoso, E., Flores-Luna, A., Pérez-Urizar, J. 2004. In vitro activity of two phenyl-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazole against albendazole-resistant *Giardia intestinalis*. *Acta Trop.* **92(3)**:237-44.

Jokipii, L. & Jokipii, A. M. 1980. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *J Infect Dis.* **141(3)**:317-25.

Jokipii, L. & Jokipii, A. M. 1979. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. *J Infect Dis.* **140(6)**:984-8.

Jokipii, L. & Jokipii, A. M. 1982. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology*. **83(2)**: 399-404.

Kappus, K. D., Lundgren, R. G. Jr. & Juranek, D. D. 1994. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**:705-713.

Kollaritsch, H., Jeschko, E. & Wiedermann, G. 1993. Albendazole is highly effective against cutaneous larva migrans but not against *Giardia* infection: results of an open pilot trial in travellers returning from the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**:689.

Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet, J. J. & Favennec, L. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *JAC*. **46**:819-821.

Lindquist, H. D. 1996. Induction of albendazole resistance in *Giardia lamblia*. *Microb Drug Resist.* **2(4)**:433-4.

López Nigro, M. M., Palermo, A. M., Mudry, M. D., Carballo, M. A. 2003. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicol In Vitro*. **17(1)**:35-40.

López-Nigro, M. M., Gadano, A. B., Carballo, M. A. 2001 Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes: Tinidazole (TNZ). *Toxicol In Vitro*. **15(3)**:209-13.

Ludwig, K. M., Frei, F., Filho, F. A., & Ribeiro-Paes, J. T. 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32**:547-555.

Luján, H. D.; Mowatt, M. R. & Nash, T. E. 1997. *Mechanisms of Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61(3)**:294-304.

MacDonald L. M., Armson A., Thompson A. R. & Reynoldson J.A. 2004. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol.* **138(1)**:89-96.

Martinez, V. & Caumes, E. 2001. Metronidazole. *Ann Dermatol Venereol.* **128(8-9)**:903-9.

McIntyre, P., Boreham, P., Phillips, R. & Shepherd, R. 1986. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and *in vitro* drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *J. Pediatr.* **108**:1005-1010.

Meloni, B., Thompson, R., Reynoldson, J. & Seville, P. 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.

Mendelson, R. M. 1980. The treatment of giardiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**:438-439.

Mendoza, D., Núñez, F. A., Escobedo, A. A., Pelayo, L., Fernández, M., Torres, D., Cordovi, R. A. 2003. Usefulness of 2 copro-parasitological methods and their utilization in an anti-giardiasis therapeutic trial. *Rev Cubana Med Trop.* **55(3)**:174-8.

Meyer, E. K. 1998. Adverse events associated with albendazole and other products used for treatment of giardiasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **213(1)**:44-46.

Mineno, T. & Avery, M. A. 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.

Minvielle M. C., Molina, N. B., Polverino, D., Basualdo, J. A. 2008. First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103(1)**:98-103.

Müller, J.; Wastling, J.; Sanderson, S. Müller, N. & Hemphill, A. 2007. A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrob Agents Chemother.* **51(6)**:1979-86.

Nash, T. E., Christopher, A. O., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.

Nash, T. E., Christopher, A. O., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.

Navarrete, N. & Torres, P. 1994. Prevalence of infection by intestinal helminths and protozoa in school children from a coastal locality in the province of Valdivia, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* **49**:79-80.

Navarrete-Vázquez, G., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Valdez, J., Morales, R., Cortés, R., Hernández, M., Castillo, R. 2001. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* **11(2)**:187-90.

Navarrete-Vázquez, G., Yépez, L., Hernández-Campos, A., Tapia, A., Hernández-Luis, F., Cedillo, R., González, J., Martínez-Fernández, A., Martínez-Grueiro, M., Castillo, R. 2003. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg Med Chem.* **11(21)**:4615-22.

- O'Handley, R. M. & Olson, M. E.** 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **22(3)**:623-43.
- Olson, M., Ceri, H. & Morck, D.** 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitol. Today.* **16(5)**:213-217.
- Oren, B., Schgurensky, E., Ephros, M., Tamir, I., Raz, R.** 1991. Single-dose ornidazole versus seven-day metronidazole therapy of giardiasis in Kibbutzim children in Israel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **10(11)**:963-5.
- Ortega, Y. R. & Adam, R. D.** 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.
- Ortiz, J. J., Ayoub, A., Gargala, G., Chegne, N. L. & Favannec, L.** 2001. Randomized clinical study of nitazoxanide compared to metronidazole in the treatment of symptomatic giardiasis in children from Northern Peru. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* **15(9)**:1409.
- Oxberry, M. E., Thompson, R. C. & Reynoldson, J. A.** 1994. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spironucleus muris* using transmission electron microscopy. *Int J Parasitol.* **24(5)**:695-703.
- Ozbilgin, A., Ertan, P., Yereli, K., Tamay, A. T., Kurt, O., Degerli, K., Balcioglu, I. C., Ok U. Z. & Onag, A.** 2002. Giardiasis treatment in Turkish children with a single dose of ornidazole. *Scand J Infect Dis.* **34(12)**:918-20.
- Pengsaa, K., Sirivichayakul, C., Pojjaroen-anant, C., Nimnual, S. & Wisetsing, P.** 1999. Albendazole treatment for *Giardia intestinalis* infections in school children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **30(1)**:78-83.
- Petri Jr., W. A.** 2003. Therapy of intestinal protozoa. *Trends in Parasitology.* **19(11)**: 523-526.
- Pierangeli, N. B., Giayetto, A. L., Manacorda, A. M., Barbieri, L. M., Soriano, S. V., Veronesi, A., Pezzani, B.C., Minvielle, M. C. & Basualdo, J. A.** 2003. Estacionalidad de parásitos intestinales en suelos periurbanos de la ciudad de Neuquén, Patagonia, Argentina. *Trop Med Int Health.* **8(3)**: 259-63
- Poiars da Silva, J. M.** 1992. Parasitoses intestinais. Considerações sobre 14 anos de estudo laboratorial no concelho da Lousã. *Rev. Port. Doenç. Infec.* **4**:259-264.
- Ponce-Macotela, M., Gómez-Garduño, J., González-Maciél, A., Reynoso-Robles, R., Anislado-Tolentino, V. & Martínez-Gordillo, M. N.** 2001. In vitro measurement of nitazoxanide sensitivity of 4 *Giardia duodenalis* isolates obtained from different hosts]. *Rev Invest Clin.* **53(1)**:41-5.

Pozio, E., 2008. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia*. **50 (1-2)**: 17-24

Reynoldson, J. A., Thompson, R. C. A. & Meloni, B. P.. 1991. *In vivo* efficacy of albendazole against *Giardia duodenalis* in mice. *Parasitol. Res.* **77**:325-328.

Rodriguez-Garcia, R., Rodriguez-Guzmán, L. M., Cruz del Castillo, Q.C.A. 1999. Eficacia y seguridad de mebendazol contra nitazoxanida en el tratamiento de *Giardia lamblia* en niños. *Rev Gastroenterol Mex*, (**64**) 3.

Rodríguez-Hernández, J., Canut-Blasco, A. & Martín-Sánchez, A. M.1996. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *Eur J Epidemiol.* **12(3)**:291-5.

Romero-Cabello, R., Guerrero, L. R., Garcia, M. R. M. & Cruz, A. G.. 1998. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**:701-703.

Rossignol, J. F., Ayoub, A. & Ayers, M. S. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of Nitazoxanide. *J. Infect. Dis.* **184**:383-384.

Samuelson, J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1533-1541.

Sangster, N., Batterham, P., Chapman, H. D., Duraisingh, M., Le Jambre, L., Shirley, M., Upcroft, J. & Upcroft, P.. 2002. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int. J. Parasitol.* **32**:637–653.

Savioli, L.; Smith, H. & Thompson, A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* **22(5)**:203-8.

Sousa, M. C. & Poiares da Silva, J. 1999. A new method for assessing metronidazol susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2939-2942.

Stephenson, L. S., Latham, M. C. & Ottesen, E. A.. 2000a. Global malnutrition. *Parasitology* **121Suppl**:S5-22.

Stephenson, L. S., Latham, M. C. & Ottesen, E. A.. 2000b. Malnutrition and parasitichelminth infection. *Parasitology* **121 Suppl**:S23-38.

Thompson, R. C. A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitology.* **126**:15-35.

Thompson, R. C., Reynoldson, J. A., & Mendis, A. H. W. 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol.* **32**:72-160.

Trinca, A., Lobo, M. R. & Abranches, P. 1990. Inquérito sobre parasitoses intestinais em três escolas primárias da área de Carnaxide (Lisboa). *Rev. Port. Doenç. Infec.* **1**:17-20.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 1998. My favourite cell: *Giardia*. *BioEssays.* **20**:256–263.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 1999. Keto-acid oxidoreductases in the anaerobic protozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**:447-449.

Upcroft, J. A., Campbell, R. W., Benakli, K., Upcroft, P. & Vanelle, P. 1999. Efficacy of new 5-nitroimidazoles against metronidazole-susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:73-76.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Upcroft, J. A., Campbell, R. W. & Upcroft, P. 1996a. Quinacrine - resistant *Giardia duodenalis*. *Parasitology.* **112**:309-313.

Upcroft, J., Mitchell, R., Chen, N. & Upcroft, P. 1996b. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin. *Microbial Drug resistance.* **2(3)**:303-308.

Upcroft, J. A., Dunn, L. A., Wright, J. T., Benakli, K., Upcroft, P. & Vanelle, P. 2006. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(1)**:344-7.

Valdez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Navarrete-Vázquez, G., Tapia, A., Cortés, R., Hernández, M. & Castillo, R. 2002. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* **12(16)**:2221-4.

Vanacova, S., Liston, D. R., Tachezy, J. & Johnson, P. J. 2003. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol.* **33(3)**:235-55..

Van-Keulen, H., Macechko, P. T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P. M. & Erlandsen, S. L. 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol.* **108(2)**:97-107.

Vesny, C. J. & Peterson, W. L. 1999. Review article: the management of Giardiasis.. *Aliment Pharmacol Ther.* **13(7)**:843-50.

Wolfe, M. S. 1998. Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:93-100.

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Georg von Samson-Himmelstjerna & Sangster, N. C. 2004. Drug resistance in veterinary helminthes. *Trends Parasitol* **20** (10): 469-476.

World Health Organization (WHO). 2000. *Overcoming Antimicrobial Resistance*. World Health Report on Infectious Diseases. World Health Organization. [Online]. <http://www.who.int/infectious-disease-report> (último acesso em 2006).

Wright, C. W., Melwani, S., Phillipson, J. D. & Warhurst, D. C.. 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Wright, J. M., Dunn, L. A., Upcroft, P. & Upcroft, J. A. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2(6)**:529-5541.

Yassin, M. M., Shubair, M. E., Al-Hindi, A. I. & Jadallah S. Y.. 1999. Prevalence of intestinal parasites among school children in Gaza City, Gaza Strip. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **29(2)**:365-373.

Zaat, J. O., Mank, T. G. & Assendelft, W. J.. 1997. A systematic review on the treatment of giardiasis. *Trop. Med. Int. Health.* **2**:63-82.

Capítulo III

Metodologias que Permitem Avaliar a Sensibilidade de *Giardia lamblia* a Antiparasitários, a Review

Metodologias que Permitem Avaliar a Sensibilidade de Giardia lamblia a Antiparasitários, a Review

Rita F. Oliveira^{1,4,5}; Jorge Balteiro^{2,4}; Maria José Alves^{3,4}; Mário J. Pereira⁴; Agostinho Cruz¹

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 4000-294 Porto, Portugal

²Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-997 Coimbra, Portugal

³Hospital Distrital de Chaves, Laboratório de Patologia Clínica, 5400-279 Chaves, Portugal

⁴Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁵Corresponding author: rfo@estsp.ipp.pt; Phone. +351 22 206 1000; fax. +351 22 206 1001

Paper in draft form

Metodologias que Permitem Avaliar a Sensibilidade de *Giardia lamblia* a Antiparasitários, a Review

Resumo:

Considerada por muitos autores a parasitose intestinal patogénica mais frequente no intestino do Homem, a giardiose é uma importante doença infecciosa em todo o mundo, assumindo-se como um grave problema de saúde pública. Pelas manifestações clínicas a que está associada, pela facilidade de transmissão, que se deve especialmente à ingestão de águas contaminadas, e pela frequência com que ocorre, sempre que se justifique, a giardiose deve ser tratada com fármacos antiparasitários que incluem essencialmente fármacos nitroimidazólicos e benzimidazólicos. De todos os fármacos disponíveis o metronidazol continua a ser considerado o fármaco de primeira linha no tratamento desta parasitose. O número crescente de casos de resistência aos tratamentos habitualmente implementados justifica a necessidade de desenvolver metodologias que permitam avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de *G. lamblia* aos antiparasitários disponíveis. Neste sentido, este trabalho teve como objectivo analisar e discutir as diferentes metodologias disponíveis para avaliar a viabilidade celular deste parasita aos diferentes fármacos prescritos, discutindo as vantagens e limitações associadas. A determinação de casos de resistência/susceptibilidade permitirá, deste modo, a selecção do fármaco mais adequado garantindo a eficácia da terapêutica implementada.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, giardiose, antiparasitários, resistência, sensibilidade.

Abstract:

Considered by many authors to be the most frequent parasite disease in the human intestine, giardiasis is an important infectious disease throughout the world, assuming itself as a serious public health problem. Due to the clinical manifestations associated with the disease, to the easiness and speed with which it is transmitted, mostly caused by the ingestion of contaminated water, whenever it is necessary, giardiasis should be treated with antiparasitic drugs including nitroimidazolic and benzimidazolic drugs. Of all available drugs metronidazol is still the first choice drug in the treatment of giardiasis. The increasing number of cases of resistance to the commonly implemented treatments justifies the need to develop methodologies which allow an evaluation, *in vitro*, of the sensibility of *G. lamblia* to the available antiparasitic drugs. The goal of this study was to analyze and discuss the different available methodologies to evaluate the cellular viability of this parasite to the different prescription drugs, while discussing the associated advantages and limitations. Determining cases of resistance/susceptibility will allow the selection of the most adequate drug, assuring the effectiveness of the implemented therapeutics.

Keywords: *Giardia lamblia*, anti-giardial agents, giardiasis, resistance, sensibility.

1. Introdução

O estudo da susceptibilidade a antibióticos tem assumido uma grande importância nos últimos anos uma vez que se tem tornado uma importante ferramenta em estudos epidemiológicos, na definição de novas estratégias terapêuticas e na descoberta de novos fármacos destinados ao combate das infecções causadas por microorganismos patogénicos.

A giardiose é considerada uma importante parasitose intestinal, associada a extrema morbidade em todo o mundo (Gardner & Hill, 2001), cujo organismo causador é a *G. lamblia* (o mesmo que *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*), parasita patogénico mais frequente no intestino do homem (Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006).

Infecções por *G. lamblia* resultam essencialmente da ingestão de água ou de alimentos contaminados. Embora a sua presença possa ser assintomática, infecções graves podem ser responsáveis por distúrbios gastrointestinais e por problemas de desenvolvimento, particularmente na criança (Adam, 2001; Cruz *et al.*, 2003b). Estão habitualmente associadas a crises persistentes de diarreia em todo o mundo, representando por isso um grave problema de saúde pública (Adam, 2001; Arguello-García *et al.*, 2004).

O tratamento de portadores assintomáticos não é uma prioridade, excepto para prevenir a transmissão da doença, especialmente a crianças, grávidas ou imunocomprometidos (como doentes com fibrose quística, hipogamaglobulinemia ou SIDA), indivíduos mais susceptíveis de desenvolver esta parasitose e/ou onde o não tratamento pode implicar o agravamento da situação clínica com conseqüente comprometimento do doente (Adam, 2001; Cruz *et al.*, 2003b; Arguello-García *et al.*, 2004; Escobedo & Cimerman, 2007).

Dentro das estratégias terapêuticas disponíveis incluem-se fármacos como o metronidazol, o tinidazol, o secnidazol e o ornidazol. O albendazol, a quinacrina a furazolidona, a paromomicina e mais recentemente a nitazoxanida, são também boas alternativas (Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Abboud, *et al.*, 2001; Valdez *et al.*, 2002; Arguello-Garcia *et al.*, 2004; Ali & Nozaki, 2007; Escobedo & Cimerman, 2007).

Embora o metronidazol e outros nitroimidazóis sejam considerados por muitos autores os tratamentos de eleição da giardiose, são cada vez mais os casos registados de falência terapêutica. Alguns estudos referem que o fracasso dos tratamentos se deve sobretudo ao desenvolvimento de resistências aos fármacos habitualmente prescritos (Nash *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Harris *et al.*, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2003b; Arguello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Escobedo & Cimerman, 2007).

O número crescente de casos de resistência registados tem vindo a justificar a necessidade de desenvolver metodologias que permitam avaliar a sensibilidade de *G. lamblia* aos fármacos disponíveis e assim implementar terapêuticas adequadas no tratamento desta parasitose.

Actualmente são muitas as metodologias disponíveis que permitem avaliar a viabilidade celular, contudo, mais recentemente, têm assumido especial interesse as metodologias que recorrem à utilização de corantes e/ou fluorocromos.

Pretende-se com este estudo comparar as diferentes metodologias descritas na literatura, tendo como objectivo identificar a mais conveniente, o que se traduz em encontrar o ensaio eficaz, mais económico, de fácil execução e rápido.

2. Metodologias que permitem avaliar a sensibilidade de *Giardia lamblia* a antiparasitários

As diferentes metodologias consistem em expor os trofozoítos de *G. lamblia* a diferentes concentrações do fármaco em estudo, durante um período determinado (normalmente 24 horas), a 37°C, em tubos fechados. Após incubação é realizada a contagem das células, determinando-se a viabilidade do parasita através de diferentes metodologias a seguir descritas.

2.1. Análise da morfologia das células

O método da morfologia das células baseia-se na análise da forma das células como forma de avaliar a sua viabilidade após exposição a antiparasitários.

Os critérios definidos para classificar trofozoítos como não-viáveis incluem deformações na aparência típica do trofozoíto, tais como distorção do contorno da membrana, formato irregular da célula, aumento significativo do tamanho da célula e alterações granulares (Argüello-García *et al.*, 2004).

No estudo de Argüello-García *et al.*, (2004) as células expostas aos fármacos em estudo mostraram uma taxa de crescimento inferior à das células que não foram expostas, o que contribui para atribuir a este método um critério de sensibilidade semelhante ao ensaio que se baseia na inibição da capacidade de multiplicação.

No entanto, e como em todas as metodologias, é necessário ter em conta o agente antiparasitário em estudo. Não se justifica a realização destes ensaios quando se pretende avaliar a viabilidade de *G. lamblia* ao metronidazol, uma vez que este fármaco não demonstra qualquer efeito sobre a morfologia dos trofozoítos a concentrações que se mostraram eficazes para outros métodos. Por seu lado, concentrações standard de albendazol permitiram observar ao microscópio alterações na morfologia dos trofozoítos provocadas por este fármaco (Edlind, *et al.*, 1990; Argüello-García *et al.*, 2004).

O ensaio da morfologia das células é um método directo, relativamente rápido e sensível, comparável a outras metodologias e é particularmente útil para avaliar o efeito dos benzimidazóis.

2.2. Observação do movimento flagelar

Estudos desenvolvidos por Jokipii & Jokipii (1980) permitiram determinar, por observação ao microscópio, a viabilidade de *G. lamblia* usando como critério a análise do movimento flagelar.

Os autores analisaram a motilidade dos trofozoítos de *G. lamblia* observando, por um período de dez segundos, especialmente o movimento do flagelo ventral.

Nesta metodologia pode acontecer que, mesmo apresentando uma morfologia correcta as células não apresentem mobilidade sendo por este motivo consideradas não viáveis.

A grande limitação desta técnica, reside no facto desta metodologia não ter em conta que os organismos podem ser não viáveis (e por isso sem capacidade de manter a parasitose) e ainda assim apresentar movimento flagelar (Ordoñez, 2001), podendo, de forma errada, ser considerados organismos viáveis (falsos positivos). Além disso, trata-se de uma metodologia que consome muito tempo e é cansativa para o operador, quando comparada com outros ensaios.

2.3. Inibição da capacidade de multiplicação dos trofozoítos

A capacidade dos trofozoítos da *G. lamblia* se multiplicarem e crescerem são critérios que permitem avaliar a viabilidade celular (Hill *et al.*, 1986).

Utilizada quando se pretende avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de *G. lamblia* a diferentes fármacos antiparasitários (Hill *et al.*, 1986), esta metodologia permite também validar outras técnicas a que se recorre com o mesmo propósito (Crouch *et al.*, 1990; Ordoñez, 2001).

Tendo por base os estudos realizados por Hill *et al.* (1986) e Edling, (1989), esta metodologia é dividida em duas fases, na primeira fase, e à semelhança das restantes técnicas, os trofozoítos são incubados em meio contendo o fármaco em estudo. Numa segunda fase realiza-se o ensaio de recrescimento que consiste em incubar os trofozoítos em meio sem fármaco a 37°C durante 48 horas.

Após este período o número de trofozoítos é determinado por contagem em câmara de Neubauer (Hill *et al.*, 1986) ou por contagem em hemocítmetro (Cedillo-Rivera & Muñoz, 1992). A percentagem de inibição do crescimento foi calculada por comparação com o crescimento apresentado nas culturas controlo, sem adição de fármaco.

Tendo em conta que o ensaio se baseia na capacidade de divisão dos trofozoítos, os resultados obtidos *in vitro* podem ser sobrevalorizados uma vez que, *in vivo*, os trofozoítos podem perder a capacidade de aderência, com conseqüente arrastamento através do intestino delgado (e por isso sem interesse clínico) antes de perderem a capacidade de divisão celular.

O ensaio de inibição da capacidade de multiplicação dos trofozoítos constitui um método sensível para avaliar os efeitos de 5-nitromidazóis e de benzimidazóis contudo, como se trata de um ensaio indirecto e demorado, pode ser substituído por outros ensaios, mais directos, sem afectar de forma significativa os dados qualitativos (Argüello-García *et al.*, 2004).

2.4. Incorporação de ³H-timidina

A incorporação de ³H-timidina é um ensaio que permite avaliar alterações de parâmetros bioquímicos dos trofozoítos uma vez que, nesta metodologia, a viabilidade celular é avaliada, *in vitro*, através da análise/quantificação da incorporação de ³H-timidina ao DNA da célula, após exposição ao fármaco em estudo.

Inicialmente, e à semelhança das restantes metodologias, os trofozoítos são incubados a 37°C durante cerca de 24 horas em meio contendo o fármaco em estudo. Findo este período as células são incubadas em meio sem fármaco a 37°C durante cerca de 2 horas. O ensaio de incorporação de ³H-timidina, inicialmente descrito por Boreham *et al.* (1984), consiste em adicionar posteriormente concentrações de ³H-timidina (12µCi/mL) aos trofozoítos em crescimento. As células mantêm-se em contacto com este composto por um período de cerca de 4 horas (Ordoñez, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

Após a incubação com ^3H -timidina os trofozoítos são lavados três a cinco vezes com tampão fosfato salino (PBS - Phosphate Buffered Saline) e ressuspensos em líquido de cintilação.

A quantidade de ^3H -timidina incorporada pelas células é determinada pela contagem de líquido de cintilação recorrendo a um detector de cintilação (Boreham *et al.*, 1984; Ordoñez, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

Diferentes estudos têm revelado que esta metodologia permite avaliar de forma relativamente rápida, simples e fiável a sensibilidade de isolados de *G. lamblia* a diferentes fármacos antiparasitários (Boreham *et al.*, 1984; Ordoñez, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

Estudos desenvolvidos por Pearce *et al.* (1996) concluíram, contudo, que este ensaio é insensível quando existe um número reduzido de organismos o que se revela uma característica indesejável num ensaio que tenha como objectivo avaliar a sensibilidade de pequenas quantidades de *G. lamblia* a diferentes fármacos. Além disso esta metodologia implica o recurso a compostos radioactivos.

A incorporação de ^3H -timidina no ADN reflecte a replicação e em menor escala a reparação celular (Boreham *et al.*, 1988). Ao permitir detectar alterações imediatas que afectam a divisão celular esta metodologia é especialmente útil na avaliação de sensibilidade de *G. lamblia* a fármacos que actuem ao nível do DNA (Ordoñez, 2001; Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

No estudo realizado por Arguello-Garcia *et al.* (2004), a incorporação de ^3H -timidina foi utilizada para avaliar a sensibilidade de *G. lamblia* a nitroimidazóis, concretamente ao metronidazol que, ao actuar ao nível do DNA, torna possível detectar alterações que podem afectar a divisão celular dos trofozoítos.

A selecção desta metodologia em ensaios de sensibilidade implica portanto o conhecimento do mecanismo de acção do fármaco em estudo, caso contrário incorre-se no risco de considerar células viáveis quando na realidade não o são (falsos positivos). Ou seja, pode acontecer que, em células não viáveis que mantenham ainda a estrutura de DNA, ocorra a incorporação de ^3H -timidina podendo, de forma errada, ser consideradas viáveis.

2.5. Inibição da aderência

A metodologia a que se recorre com mais frequência para avaliar a viabilidade de *G. lamblia* aos fármacos habitualmente prescritos baseia-se na avaliação da perda da capacidade de aderência dos trofozoítos à superfície do vidro/plástico do suporte de cultura (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001).

De facto, a capacidade de fixação dos trofozoítos de *G. lamblia* à mucosa gastrointestinal do hospedeiro é uma das principais características deste parasita (Ortega *et al.*, 1997; Adam, 2001) sendo considerado um importante requisito para a patogenicidade da parasitose uma vez que é fundamental para a colonização e manutenção da infecção (Crouch *et al.*, 1990; Crouch *et al.*, 1991; Adam, 2001).

A sobrevivência do parasita bem como a manutenção da parasitose está portanto dependente da sua capacidade de aderência, sem as quais os trofozoítos se encontrariam expostos ao efeito do peristaltismo intestinal que os arrastaria ao longo do intestino conduzindo à sua expulsão do organismo e consequente morte (Crouch *et al.*, 1990; Crouch *et al.* 1991; Favennec *et al.*, 1992; Farbey *et al.*, 1995; Ordoñez, 2001). Pela importância que assume na patogenicidade da parasitose, a inibição de aderência poderá constituir um importante alvo para agentes anti-giardiais.

Esta metodologia inicialmente descrita por Meyer (1970) e mais tarde adaptada por Meloni *et al.* (1990), consiste em incubar uma quantidade determinada de trofozoítos a 37°C durante um período que pode variar entre os quarenta e cinco minutos a uma hora (Pearce *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2003a) para permitir que os trofozoítos adiram às paredes do tubo de cultura. De seguida são adicionadas, a cada tubo de cultura, diluições apropriadas do antiparasitário em estudo de forma a obter séries de concentrações desejadas. Após incubação a 37°C durante cerca de 24h em meio contendo o fármaco em estudo, as culturas são analisadas recorrendo a um microscópio invertido de forma a determinar o número de trofozoítos aderentes à parede dos tubos, por campo visual, com ampliação de 200x (Cruz *et al.*, 2003a; Pearce *et al.*, 1996).

A inibição da aderência é determinada por comparação com os valores do controlo de cada ensaio.

Por se basear na aderência dos trofozoítos à superfície do suporte de cultura (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 2001), nesta metodologia a contagem celular depende da distribuição homogénea das células aderentes na superfície e partem do princípio que apenas as viáveis aderem (Ordóñez, 2001), o que a torna uma metodologia associada a uma certa subjectividade na selecção dos campos a considerar para a realização das contagens (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003b).

Não obstante, esta metodologia é considerada por muitos autores uma metodologia de execução simples, relativamente rápida, sensível, que não envolve corantes nem equipamentos complexos e que apresenta resultados rigorosos e fiáveis, o que torna este método uma boa opção quando se pretende avaliar a acção de fármacos anti-giardiais.

2.6. Redução metabólica de sais tetrazolium

As metodologias que recorrem à utilização de sais tetrazolium na avaliação da viabilidade celular são consideradas colorimétricas uma vez que se baseiam na determinação de mudanças de coloração. Os indicadores colorimétricos mais frequentemente utilizados para determinar a viabilidade celular incluem compostos como o XTT [2,3 - bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 5 - (fenilamnocarbonil - tetrazolium)] e o MTT (3, (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 - difenil-tetrazolium bromidio) (Smee *et al.*, 2002).

À semelhança de outras metodologias este é um ensaio que permite avaliar alterações de parâmetros bioquímicos dos trofozoítos uma vez que a viabilidade celular é avaliada, *in vitro*, através da análise/quantificação de um composto resultante de uma reacção que ocorre no interior das células viáveis.

Inicialmente, e à semelhança das restantes metodologias, os trofozoítos são incubados a 37°C durante cerca de 24 horas em meio contendo o fármaco em estudo. O ensaio por redução metabólica de sais tetrazolium consiste em,

terminado este período, ressuspender as células em meio sem fármaco adicionando uma concentração determinada do corante (MTT ou XTT). Os trofozoítos são então incubando a 37°C durante um período que pode variar entre 2 a 6 horas consoante a metodologia aplicada e a densidade celular.

Durante o período de incubação os sais tetrazolium são incorporados pelas células viáveis, e portanto metabolicamente activas, e são convertidos/reduzidos pelas desidrogenases a derivados formazan provocando uma mudança de coloração (Cedillo-Rivera, *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1992; Bénéré, *et al.*, 2007).

A coloração registada traduz a intensidade da reacção ocorrida no interior das células com actividade metabólica, reflectindo a sua viabilidade e pode ser observada por inspecção visual ou medida por espectrofotometria. O excesso de coloração deve ser eliminado recorrendo a uma solução de tampão fosfato salino - PBS (Phosphate Buffered Saline).

Pode acontecer no entanto que, células que já tenham perdido a sua capacidade proliferativa, e portanto células não viáveis, apresentem ainda actividade metabólica, permitindo a conversão dos sais tetrazolium a derivados formazan, ocorrendo uma mudança de coloração. Este acontecimento poderá enviesar os resultados e ser responsável por valores mais elevados de células consideradas viáveis, quando na realidade não o são (falsos positivos).

Um aspecto importante a considerar é que os sais tetrazolium podem rapidamente ser reduzidos pelo próprio meio de cultura devido à presença de agentes redutores como ácido ascórbico, L-cisteína ou extracto de levedura (Bénéré, *et al.*, 2007). Pelos motivos expostos a remoção do meio é essencial e não afecta os resultados do ensaio uma vez que a maioria dos trofozoítos se encontra aderente (Ghosh *et al.*, 2001).

Os sais tetrazolium são reduzidos a derivados formazan através da aceitação de electrões. Esta reacção ocorre por acção enzimática ou por acção química através do recurso a transportadores artificiais. Os transportadores de electrões artificiais mais frequentemente utilizados em ensaios de viabilidade celular, com a finalidade de promover e/ou facilitar a reacção entre os trofozoítos e o corante utilizado, incluem a menadiona ou o metassulfato de fenazina (PMS) (Scudiero *et al.*, 1988).

A adição de transportadores de electrões artificiais permite portanto catalisar a reacção de redução dos sais tetrazolium permitindo que a reacção ocorra de uma forma mais rápida o que torna possível reduzir, de forma considerável, o tempo de incubação das células com o corante (Cedillo-Rivera, *et al.*, 1992), considerado até então um dos aspectos mais negativos desta metodologia.

Quando comparado com as técnicas mais convencionais, como a incorporação de ^3H -timidina, esta metodologia colorimétrica apresenta como vantagens a economia no custo dos reagentes e equipamento, trabalho reduzido pela eliminação de etapas no processamento das amostras requeridas para a contagem, assim como evitam problemas de segurança e eliminação de resíduos associados à utilização de rádio-isótopos (Roehm *et al.*, 1991).

De uma forma geral, a utilização de sais tetrazolium com adição de transportadores de electrões artificiais demonstrou ser um método relativamente rápido, económico, sensível e de fácil execução para determinar a viabilidade celular (Cedillo-Rivera, *et al.*, 1992).

2.6.1. MTT (3, (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 - difenil-tetrazolium bromidio)

Este método baseia-se na redução do MTT a derivados formazan através de enzimas, especialmente desidrogenases, de células viáveis. Os cristais de formazan, produto resultante da conversão do MTT, apresentam coloração púrpura que pode ser quantificada/determinada por espectrofotometria a 570nm (Cedillo-Rivera, *et al.*, 1992; Bénéré *et al.*, 2007).

Um dos aspectos negativos desta metodologia deve-se à baixa solubilidade dos cristais de formazan formados levando à necessidade de recorrer à utilização de álcool isopropil acidificado (0,04M HCl em isopropanol) que permite extrair e dissolver, do interior das células, o produto formado para posterior quantificação (Cedillo-Rivera, *et al.*, 1992).

Segundo Ordoñez (2001), os resultados obtidos com esta metodologia são variáveis devido à baixa solubilidade do produto formazan e à precipitação de proteínas aquando da adição do solvente orgânico para dissolver o formazan.

2.6.2. XTT [2,3 - bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil) - 5 - (fenilamino-carbonil - tetrazolium) -2H-hidróxido de tetrazolium]

Este método baseia-se na capacidade que as células metabolicamente activas, e portanto células viáveis, apresentam para reduzir o XTT a derivados formazan pelas desidrogenases. Os derivados de formazan formados apresentam coloração alaranjada que pode ser quantificada/determinada por espectrofotometria a 450nm (Roehm *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1992; Bénére *et al.*, 2007).

Ao contrário de outros sais tetrazolium, como o MTT, a redução do XTT conduz à produção de um produto de formazan hidrossolúvel que pode ser quantificado directamente.

Comparativamente com o MTT e sob condições óptimas, o XTT apresenta um elevado grau de sensibilidade, ao mesmo tempo que oferece uma economia de tempo e trabalho considerável, uma vez que não é necessário solubilizar o produto de formazan antes de determinar a absorvância (Scudiero *et al.*, 1988; Roehm *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1992).

2.7. Fluorocromos

Além dos corantes, os ensaios de viabilidade celular podem recorrer a fluorocromos que, à semelhança dos primeiros, se baseiam na determinação de mudança de coloração que pode ser detectada por microscopia de epifluorescência ou quantificada por espectrofluorimetria.

O recurso a fluorocromos permite a marcação de componentes celulares específicos, por ligações a moléculas estruturais ou funcionais, como é o caso do iodeto de propídio (PI). Podem ainda ser utilizados para identificar células metabolicamente activas em que o fluorocromo é convertido a um composto fluorescente na presença de actividade metabólica, como se verifica com o diacetato de fluoresceína (FDA).

Muitos ensaios de viabilidade celular recorrem à coloração simultânea com FDA e PI (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Arguello-Garcia *et al.*, 2004)

A utilização de FDA-PI para comparação de diferentes 5-nitromidazóis em ensaios de viabilidade celular de *G. lamblia* apresentou resultados semelhantes ao ensaio de inibição da capacidade de multiplicação dos trofozoítos, havendo diferenças apenas no que respeita à magnitude (Argüello-García *et al.*, 2004). Com este ensaio obtêm-se resultados mais consistentes após períodos mais longos de exposição aos corantes (Jones & Senft, 1985).

Os resultados obtidos de diferentes estudos têm revelado que a metodologia FDA-PI apresenta vantagens em termos de custos, duração do ensaio e autonomia de realização (Schupp e Erlandsen, 1987). Trata-se de um ensaio fácil execução e que permite obter resultados de forma rápida (Iturriaga *et al.*, 2001).

O ensaio consiste em incubar a 37°C trofozoítos de *G. lamblia* durante cerca de 24 horas em meio contendo o fármaco em estudo. O ensaio recorrendo a FDA-PI consiste em, terminado este período, ressuspender as células em meio sem fármaco adicionando uma concentração determinada dos fluorocromos. Os trofozoítos são depois incubados a 37°C durante cerca de 20 minutos, consoante a metodologia aplicada e a densidade celular.

2.7.1. Iodeto de Propídio

O iodeto de propídio (PI) é um composto que penetra apenas nas células com membrana celular danificada e portanto consideradas não viáveis e actua por ligação aos ácidos nucleicos de cadeia longa intercalando-se entre as bases. A ligação do iodeto de propídio ao DNA das células forma um complexo fluorescente, de cor avermelhada, que permite a sua detecção a um comprimento de onda de 617nm (emissão) depois de expostas a uma radiação de 535nm (excitação) (Jones & Senft, 1985; Sauch *et al.*, 1991; Arguello-Garcia *et al.*, 2004).

É importante referir que a exposição das células a outros agentes que se intercalam com o DNA possam afectar a ligação que se estabelece entre este

fluorocromo e o DNA conduzindo a interpretações erróneas de viabilidade celular (Krishan *et al.*, 1978; Alabaster *et al.*, 1978; Alabaster *et al.*, 1979; Hamilton *et al.*, 1980).

2.7.2. Diacetato de Fluoresceína

Contrariamente ao PI, o diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto apolar que atravessa facilmente a membrana celular das células viáveis onde, por acção das esterases intracelulares, é hidrolisado a acetato e fluoresceína (Clarke *et al.*, 2001). As propriedades fluorescentes da fluoresceína permitem detectar a viabilidade celular uma vez que, quando expostas a uma radiação de 490nm (excitação), as células que acumulam este composto no seu interior, exibem uma fluorescência verde emitida a um comprimento de onda de 514nm (emissão) (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch *et al.*, 1991; Prudêncio *et al.*, 2002; Iturriaga *et al.*, 2001).

Um estudo com células de mamíferos realizado por Rotman & Papermaster (1966) permitiu concluir que a retenção intracelular da fluoresceína é dependente da integridade da membrana celular.

Assim, e na sequência do exposto, a detecção de células com fluorescência verde está dependente da integridade da membrana celular, que permita uma acumulação de fluoresceína no interior da célula, bem como da existência de actividade esterásica, necessária à conversão do diacetato de fluoresceína em fluoresceína.

À semelhança do que acontece aquando da utilização de sais tetrazolium, poderá verificar-se a ocorrência de falsos positivos o que pode conduzir a interpretação erradas dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade. Este acontecimento pode ser justificado uma vez que, células que tenham já perdido a sua capacidade proliferativa (e portanto células não viáveis) podem apresentar ainda actividade esterásica, permitindo portanto a conversão do FDA em fluoresceína sendo, portanto, consideradas células viáveis.

3. Considerações Finais

Sendo a giardiose uma das parasitoses intestinais mais frequentes e verificando-se um aumento no número de casos de resistência aos fármacos habitualmente prescritos, torna-se indispensável avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* a diferentes fármacos de forma a comprovar, ou não, a existência de estirpes resistentes (Majewska *et al.*, 1991; Townson *et al.*, 1992; Upcroft *et al.*, 1993).

Após exposição aos fármacos, a viabilidade de *G. lamblia* pode ser determinada tendo por base diferentes critérios, nos quais se incluem parâmetros fisiológicos como a morfologia, a motilidade, a capacidade de aderência, e a capacidade de multiplicação (Farbey *et al.*, 1995; Hill, Pohl & Pearson, 1986); e parâmetros bioquímicos, onde se insere a actividade enzimática e a incorporação de isótopos radioactivos (Wright *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 1998; Sousa & Poiars da Silva, 1999).

As diferentes metodologias a que se recorre para avaliar a viabilidade celular podem ser comparadas utilizando como parâmetro a concentração inibitórias 50 (IC₅₀), concentração de fármaco que conduz à morte de 50% dos trofozoítos.

De entre todas as metodologias em análise, o ensaio de inibição da capacidade de multiplicação parece ser o mais adequado para avaliar o efeito dos fármacos benzimidazólicos, onde se inclui o albendazol (Argüello-García *et al.*, 2004).

A incorporação de corantes e as alterações morfológicas constituem medidas sensíveis da viabilidade das células quando os trofozoítos de *G. lamblia* são expostos ao metronidazol e ao albendazol, respectivamente (Argüello-García *et al.*, 2004; Ordóñez, 2001).

No que respeita à capacidade de inibição da aderência, os valores da IC₅₀ encontrados por Farbey *et al.* (1995) foram semelhantes aos obtidos em estudos que utilizaram diferentes métodos de susceptibilidade.

Os resultados encontrados para o metronidazol foram comparáveis aos obtidos no ensaio de incorporação de ³H-timidina (Boreham, *et al.*, 1984), ou na produção de formazan solúvel (Wright *et al.*, 1992).

Por sua vez, valores da IC₅₀ semelhantes para o albendazol foram obtidos por Meloni *et al.* (1990) e Morgan *et al.* (1993), recorrendo ao mesmo ensaio que Farbey *et al.* (1995). As semelhanças encontradas sugerem que o ensaio de inibição da aderência é tão sensível quanto outras técnicas descritas.

Genericamente, as primeiras metodologias desenvolvidas eram consideradas trabalhosas, consumiam algum tempo a serem realizados ou exigiam a utilização de material marcado radioactivamente. Actualmente, têm-se utilizado um maior número de ensaios colorimétricos baseados na actividade enzimática de *G. lamblia* sobre determinados substratos.

A implementação de uma metodologia que permita, de uma forma rotineira, obter o perfil de sensibilidade/resistência de *G. lamblia* a diferentes antiparasitários possibilita, por um lado determinar o mecanismo de resistência envolvido e por outro lado seleccionar o fármaco adequado, que garanta a eficácia terapêutica.

A aplicação clínica dos testes susceptibilidade *in vitro* tem sido limitada pela falta de reprodutibilidade o que justifica a necessidade de desenvolver trabalhos de investigação no sentido de uniformizar as metodologias de avaliação da sensibilidade disponíveis.

4. Referências Bibliográficas

Abboud, P., Lemée V., Gargala G., Brasseur P., Ballet J. J., Borsa-Lebas F., Caron F. & Favennec L. 2001. Successful treatment of Metronidazol-and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.

Alabaster, O., Magrath, I. T., Habbersett, M.C. & Herman, C.J. 1979. Effects of cyclophosphamide on the mithramycin – DNA fluorescence of human lymphoma cells: A possible result of guanine alkylation. *The Journal of Histochemistry and cytochemistry.* **27**(1):500-504

Alabaster, O., Tannenbaum, E., Habbersett, M.C. Magrath, I., & Herman, C. 1978. Drug-induced changes in DNA fluorescence intensity detected by flow microfluorometry and their implications for analysis of DNA content distributions. *Cancer research.* **38**:1031-1035.

Ali, V. & Nozaki, T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* **20**(1):164-87.

Arguello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres, G.. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.

Bénére, E.; Luz, R. A.; Vermeersch, M.; Cos, P. & Maes, L. 2007. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods.* **71**(2):101-6.

Boreham, P. F. L., Phillips, R. E. & Shepherd, R. W. 1984. The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemoth.* **14**:449-461.

Boreham, P. F. L., Phillips, R. E. & Shepherd, R. W. 1988b. Altered uptake of metronidazole *in vitro* by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* **82**:104-106.

Cedillo-Rivera, R. & Muñoz, O. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **37**:221-224.

Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J., Martinez-Palomo, A., & Pierres, G. 1991. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Méd.* **22**:79-85.

- Clarke, J. M., Gillings, M. R., Altavilla, N. & Beattie, A. J. 2001. In vitro Pharmacodynamics of Amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **(49) 3**: 945-951
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M. & Thong, Y. H. 1990. Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:246-248.
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M., Smith, S. E. & Thong, Y. H. 1991. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:375-379.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Leite, E., Sousa, J. C. F. & Cabral, M. 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Silva, M. C., Sousa, J. C. F., Manso, O. & Cabral, M. 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.
- Edlind, T. D., Hang, T. & Chakraborty, P.. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* **162**:1408-1411.
- Edling, T. D. 1989. Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:484-488.
- Escobedo, A. A. & Cimerman, S. 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother.* **8(12)**:1885-902.
- Farbey, M. D., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. 1995. In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol.* **25(5)**:593-9.
- Favennec, L., Chochillon, C., Magne, D., Meillet, D., Raichvarg, D., Savel, J. & Gobert, J. G. 1992. A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cells. *Parasitol Res.* **78(1)**:80-1.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.
- Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R. & Samuelson, J. 2001. How *Giardia* swim and divide. *Infect Immun.* **69**:7866-72.

- Hamilton, V. T., Habbersett, M. C., Herman, C. J.** 1980. Flow microfluorometric analysis of cellular DNA: Critical comparison of mithramycin and propidium iodide. *J Histochem Cytochem.* 1980 **28(10)**:1125-8.
- Harris, J. C., S. Plummer & D. Lloyd.** 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.
- Hausen, M. A., Freitas, J. C. Jr. & Monteiro-Leal, L. H.** 2006. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol.* **113(3)**:135-41.
- Hill, D., Pohl, R. & Pearson, R.** 1986. *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**:1129-1133.
- Iturriaga, R.; Zhang, S.; Sonek, G. J. & Stibbs, H.** 2001. Detection of respiratory enzyme activity in *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts using redox dyes and immunofluorescence techniques. *J Microbiol Methods.* **46(1)**:19-28
- Jokipii, L. & Jokipii, A. M.** 1980. In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *J Infect Dis.* **141(3)**:317-25.
- Jones, K. H. & Senft, J. A.** 1985. An Improved Method to determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal Of Histochemistry and Cytochemistry,* **(33)** 1:77-79.
- Kang, E. W., Clinch, K., Furneaux, R.H., Harvey, J. E., Schofield, P. J. & Gero, A. M.** 1998. A novel and simple colorimetric method for screening *Giardia intestinalis* and anti-giardial activity in vitro. *Parasitology,* **117**: 229-234.
- Krishan, A., Ganapathi, R. N. & Israel, M.** 1978. Effect of adriamycin and analogs on the nuclear fluorescence of propidium iodide-stained cells. *Cancer Res.* **38 (11 Pt 1)**:3656-62.
- Majewska, A. C., Kasprzak, W., De-Jonckheere, J. F. & Kaczmarek, E.** 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:67-69.
- Meloni, B., Thompson, R., Reynoldson, J. & Seville, P.** 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.
- Meyer, E. A.** 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol.* **27**:179-183.
- Morgan, U. M., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. A.** 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.

Nash, T. E., Christopher, A. O., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A. 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28

Ordóñez, M. G. 2001. Ensayos Farmacologicos in vitro para evaluar actividad anti-giardiasica. *Rev Cubana Farm;* **35(1)**:66-73.

Ortega, Y. R. & Adam, R. D. 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.

Pearce, D., Reynoldson, J. & Thompson, R. 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.

Prudêncio, C., Abrantes, B., Lopes, I. & Tavares, M. A. 2002. Structural and functional cellular and alterations underlying the toxicity of methamphetamine in rat retina and prefrontal córtex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **965**: 522-528.

Roehm, N. W., Rodgers, G.H., Hatfield, S. M. & Glasebrook, A. L. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, **142**: 257-265.

Rotman, B., Papermaster, B. W. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Biochemistry.* **55**: 134:141.

Sauch, J. F., Flanigan, D., Galvin, M. L., Berman, D. & Jakubowski, W. 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **57(11)**:3243-7.

Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A. 2006. *Giardia* and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* **22(5)**:203-8.

Schupp, D. G. & Erlandsen, S. L. 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* **53(4)**:704-7.

Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D. & Boyd M. R. 1988. Evaluation of a soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensivity in Culture Using human and other Tumor Cell Lines. *Cancer research* **48**: 4827-4833.

Smee, D. F., Morrison, A. C., Barnard, D. L. & Sidwell, R. W. 2002 Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *J Virol Methods.* **106(1)**:71-9.

Sousa, M. C. & Poiares da Silva, J. 1999. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2939-2942.

Townson, S. M., Laqua, H., Upcroft, P., Boreham, P. & Upcroft, J. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Upcroft, J. A., Dunn, L. A., Wright, J. T., Benakli, K., Upcroft, P & Vanelle, P. 2006. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50** (1):344-7.

Valdez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Navarrete-Vázquez, G., Tapia, A., Cortés, R., Hernández, M. & Castillo, R. 2002. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* **12**(16):2221-4.

Wright, C. W., Melwani, S., Phillipson, J. D. & Warhurst, D. C. 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Wright, J. M., Dunn, L. A., Upcroft, P. & Upcroft, J. A. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2**(6):529-5541.

Capítulo IV
Avaliação da Sensibilidade de *Giardia*
***lamblia* ao Metronidazol**

Avaliação da Sensibilidade de *Giardia lamblia* ao Metronidazol

Rita Ferraz Oliveira^{1,4,5}; Jorge Balteiro^{2,4}; Maria José Alves^{3,4}; Mário J. Pereira⁴; Agostinho Cruz¹

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 4000-294 Porto, Portugal

²Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, 3040-997 Coimbra, Portugal

³Hospital Distrital de Chaves, Laboratório de Patologia Clínica, 5400-279 Chaves, Portugal

⁴Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁵Corresponding author: rfo@estsp.ipp.pt; Phone. +351 22 206 1000; fax. +351 22 206 1001

Paper in draft form

Avaliação da Sensibilidade de *Giardia lamblia* ao Metronidazol

Resumo:

Objectivo:

Embora estejam já descritas diversas metodologias que permitem avaliar a viabilidade celular de *G. lamblia*, não existe ainda uma metodologia normalizada no que concerne à avaliação da sensibilidade/resistência de trofozoítos de *G. lamblia* aos diferentes agentes antiparasitários, o que acarreta dificuldades na comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos. Neste sentido, espera-se com este trabalho contribuir para o desenvolvimento e implementação de metodologias expeditas que permitam avaliar, *in vitro*, a susceptibilidade deste parasita aos fármacos habitualmente prescritos. Pretende-se obter uma metodologia de simples execução, em microescala, e portanto menos dispendiosa, que permita alcançar resultados mais rápidos e mais fiáveis.

Metodologia:

A viabilidade de trofozoítos de *G. lamblia* (ATCC 30888) ao metronidazol, fármaco habitualmente prescrito no tratamento desta parasitose, foi determinada recorrendo às metodologias de inibição de aderência (ADE), diacetato de fluoresceína (FDA), iodeto de propídio (PI) e um derivado tetrazolium (XTT).

Resultados:

Para a concentração que inibiu 50% dos isolados (IC₅₀) foram obtidos valores de 2,99µM, 9,87µM e 8,93µM para a metodologia ADE, FDA e XTT, respectivamente. A metodologia PI não foi considerada uma vez que apresentou resultados incongruentes.

Conclusões:

Fazendo uma análise das metodologias em estudo, constatou-se que as metodologias FDA e XTT apresentaram valores de IC₅₀ mais próximos. Na metodologia ADE, registaram-se valores cerca de três vezes inferiores. Os resultados revelam a proximidade entre a metodologia FDA e a metodologia XTT (*p-value*>0,05). A selecção da melhor metodologia deve ter em conta o mecanismo de actuação do fármaco em estudo bem como a disponibilidade de equipamento necessário à execução das diferentes metodologias.

Palavras-chave: *Giardia lamblia*, resistência, sensibilidade, viabilidade, metronidazol, inibição de aderência, diacetato de fluoresceína, iodeto de propídio, derivado tetrazolium.

Abstract:

Objective:

Although many methodologies have already been described which allow us to evaluate the cellular viability of *G. Lamblia*, there still isn't a normalized methodology concerning the evaluation of the sensibility/resistance of *G. lamblia* trophozoites to the different anti parasite agents, which causes difficulties in comparing results obtained in different studies. Therefore, this study aims to contribute to the development and implementation of expeditious methodologies which allow us to evaluate, in vitro, the susceptibility of this parasite to the commonly prescribed drugs, aspiring to obtain a methodology which is simple to carry out, in micro scale, and therefore less expensive allowing us to achieve quicker and more reliable results.

Methodology:

The viability of *G. lamblia* trophozoites to metronidazol, the drug commonly prescribed in treating this parasite disease, has been determined using the inhibition of adherence method (ADE), fluorogenic dyes fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) and a tetrazolium derivate (XTT) reduction.

Results:

Sensibility results estimated IC₅₀ values of 2,99µM, 9,87µM and 8,93µM for ADE, FDA and XTT, respectively. PI was not considered due to inconsistent results.

Conclusion:

Analyzing the methodologies being studied, we can establish that the FDA and the XTT methods present the closest values of IC₅₀. Values obtained with ADE were three times lower. The selection of the best methodology must take into account the action mechanism of the drug as well as the availability of the necessary equipment to implement the different methodologies.

Keywords: *Giardia lamblia*, resistance, sensibility assay, viability assay, metronidazole, inhibition of adherence, fluorescein diacetate, propidium iodide, tetrazolium derivate.

1. Introdução

Também denominada por *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis*, a *Giardia lamblia* é o parasita protozoário patogénico mais frequente no intestino do Homem (Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006), causador de extrema morbidade em todo o mundo (Gardner & Hill, 2001).

Infecções por *G. lamblia* são frequentemente associadas a problemas gastrointestinais, sendo uma das causas mais comuns de diarreia em todo o mundo (Adam, 2001; Arguello-García *et al.*, 2004). As crianças e os doentes imunodeprimidos são os mais afectados (Adam, 2001; Cruz *et al.*, 2003b; Escobedo & Cimerman, 2007).

A estratégia terapêutica inclui diversos agentes antiparasitários de uso tradicional, incluindo nitroimidazóis como o metronidazol, tinidazol, secnidazol e o ornidazol, bem como benzimidazóis onde se destaca o albendazol. Fármacos como a quinacrina, a furazolidona, a paromomicina e a nitazoxanida, são também boas alternativas terapêuticas (Nash *et al.*, 2001; Gardner & Hill, 2001; Harris *et al.*, 2001; Abboud, *et al.*, 2001; Valdez *et al.*, 2002; Arguello-García *et al.*, 2004; Ali & Nozaki, 2007; Escobedo & Cimerman, 2007).

Dos antiparasitários referidos, o metronidazol é considerado o fármaco de eleição no tratamento da giardiose (Harris *et al.*, 2001; Arguello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Escobedo & Cimerman, 2007). No entanto, estudos apontam para o aumento da frequência de casos de resistências ao tratamento com este fármaco (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2003b; Arguello-García *et al.*, 2004). Casos de resistência foram também descritos para outros fármacos (Upcroft & Upcroft, 2001).

O aumento da ocorrência de casos de resistências, tem-se traduzido numa maior preocupação relativamente à melhor terapêutica a implementar, tornando-se indispensável determinar o perfil de susceptibilidade/resistência de *G. lamblia* aos fármacos habitualmente prescritos. Neste sentido, têm sido propostas diferentes metodologias que permitem avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de *G.*

lamblia a diferentes anti-parasitários. Contudo, os ensaios são, na generalidade, realizados em tubos de cultura de grande volume, tornando-se por isso mais dispendiosos. São ensaios trabalhosos, consomem muito tempo e traduzem poucos resultados (Upcroft & Upcroft, 2001).

Além disso, a grande maioria dos estudos (de diagnóstico, epidemiológicos e de viabilidade) têm sido realizados na fase de quisto. No entanto, são os trofozoítos os responsáveis pela doença (Tessier & Davies, 1999; Adam, 2001), pelo que, estudos desenvolvidos nesta fase constituem a ferramenta laboratorial *standard* e fundamental para a investigação na descoberta de novos fármacos e avaliação de resistência aos fármacos existentes.

Neste sentido, é objectivo deste trabalho desenvolver e implementar uma metodologia, alternativa às existentes, que permita avaliar, *in vitro*, a susceptibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* ao metronidazol, antiparasitário mais frequentemente utilizado no combate a esta parasitose. Pretende-se obter uma metodologia de simples execução, em microescala, e portanto menos dispendiosa, que permita alcançar resultados mais rápidos e mais fiáveis.

Por representar a metodologia a que se recorre com mais frequência para avaliar a viabilidade de *G. lamblia* (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003a), a metodologia que se baseia na avaliação da perda da capacidade de aderência dos trofozoítos à superfície do plástico do suporte de cultura, será, neste estudo, considerada a metodologia de referência.

A viabilidade celular pode também ser determinada recorrendo à utilização de corantes e fluorocromos. Ambos se baseiam na determinação de mudanças de coloração que pode ser quantificada por espectrofotometria ou espectrofluorometria, caso se trate de corantes ou fluorocromos, respectivamente.

O conhecimento do perfil de resistência/sensibilidade de *G. lamblia*, permitirá uma selecção mais adequada do composto a administrar a cada doente, contribuindo para uma terapêutica eficaz e para o uso racional dos medicamentos. Além disso, a detecção de casos de resistências aos fármacos habitualmente prescritos impulsionará o desenvolvimento de novas moléculas que serão alternativas terapêuticas aos fármacos actualmente existentes.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção de culturas axénicas de trofozoítos de *G. lamblia* e Preparação do estudo

Foram utilizados trofozoítos de *G. lamblia* obtidos de um isolado de referência *Portland-1* (ATCC 30888) adquirido à *American Type Culture Collection* e descrito como sensível ao metronidazol.

Os trofozoítos de *G. lamblia* foram cultivados em meio de cultura TYI-S-33 modificado (Keister, 1983). Utilizado até uma semana após a sua preparação (Arguello-García *et al.*, 2004), o meio de cultura foi esterilizado por ultrafiltração com membrana filtrante de 0,45µm (Sistema de ultrafiltração Nalgene - modelo DS0320) e armazenado a uma temperatura entre os 2-4°C.

As culturas foram mantidas em tubos de 10 mL de face plana (Nunc™ Tubes Nunclon®) e incubados a 37°C, até se estabelecer uma monocamada de trofozoítos, renovando-se o meio de forma a permitir que a cultura se expandisse.

Para atingir baixa concentração de oxigénio, condição necessária ao crescimento dos trofozoítos, os tubos de cultura foram preenchidos com 90-95% da sua capacidade total. Nos ensaios com recurso a microplacas o meio pobre em oxigénio foi conseguido através de um sistema de Anaerocult®C (Merck).

As suspensões celulares, necessárias à realização dos ensaios de sensibilidade, foram obtidas por refrigeração das culturas em gelo durante cerca de 20 minutos. O arrefecimento das culturas permite a desaderência dos trofozoítos das paredes dos tubos de cultura.

A concentração de células na suspensão final foi determinada numa câmara de *Neubauer*, recorrendo a um microscópio (Microscópio Nikon, modelo Eclipse E600, com óptica de contraste interferencial de fase (DIC)).

Sempre que o meio de cultura pudesse comprometer um ensaio os trofozoítos foram lavados e ressuspendidos em tampão fosfato salino (PBS).

2.2. Antiparasitário

Em todos os ensaios de sensibilidade/resistência realizados foi utilizado o metronidazol (M 1547, Sigma) preparado em soluções aquosas concentradas para o efeito.

2.3. Avaliação, *in vitro*, da sensibilidade de *G. lamblia* ao metronidazol

Foram comparadas quatro metodologias distintas que permitiram determinar a viabilidade de trofozoítos de *G. lamblia* ao metronidazol concretamente: inibição de aderência (ADE), diacetato de fluoresceína (FDA), iodeto de propídio (PI) e um derivado tetrazolium (XTT).

Os diferentes ensaios tiveram como finalidade determinar a concentração de metronidazol que inibe 50% dos trofozoítos (IC_{50}) de isolados de *G. lamblia*. Todos os ensaios foram realizados em duplicado e em todos foi preparado um branco.

Em todas as metodologias em estudo foram incubados 5×10^5 trofozoítos de *G. lamblia* (ATCC 30888) a 37°C durante 24 horas em meio de cultura TYI-S-33 modificado (Keister, 1983) contendo diluições apropriadas de metronidazol de forma a obter séries de concentrações de fármaco entre 1,8 μ M e 250 μ M. Após o período de incubação a susceptibilidade/resistência dos trofozoítos de *G. lamblia* ao metronidazol foi avaliada recorrendo às metodologias em estudo.

2.3.1 Inibição da aderência (ADE)

A metodologia baseada na perda da capacidade de aderência (ADE) dos trofozoítos à superfície do vidro/plástico do suporte de cultura foi inicialmente descrita por Meyer (1970) e mais tarde adaptada por Meloni *et al.* (1990).

Nesta metodologia, após o período de incubação de 24 horas, as culturas de *G. lamblia* foram analisadas, recorrendo a um microscópio invertido (Nikon, modelo Eclipse TC300, com óptica de contraste Hoffman), de forma a determinar o número de trofozoítos aderentes à parede dos tubos, por campo visual, com ampliação de 200x (Pearce *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2003a).

A inibição da aderência foi determinada por comparação com os valores do controlo de cada ensaio. O resultado foi apresentado como percentagem de inibição (%I), de acordo com a fórmula:

$$\%I = (N.^{\circ} \text{ células controlo} - N.^{\circ} \text{ células teste}) / N.^{\circ} \text{ células controlo} \times 100$$

2.3.2 Redução metabólica de sais tetrazolium (XTT)

A utilização de sais tetrazolium, concretamente o XTT [2,3 - bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 5 - (fenilaminocarbonil - tetrazolium)], em ensaios de viabilidade celular baseia-se no facto destes compostos penetrarem nas células viáveis, e portanto metabolicamente activas, sendo convertidos pelas desidrogenases a derivados formazan de cor púrpura. A formação deste composto provoca uma mudança de coloração que permite a quantificação dos trofozoítos viáveis a 450nm (Wright *et al.*, 1992).

A adição de metassulfato de fenazina (PMS) tem como finalidade acelerar a reacção de redução dos sais tetrazolium reduzindo o tempo de incubação das células com o corante.

O XTT/PMS (TOX2-Sigma) foi preparado por dissolução em PBS a uma concentração final de 1mg/mL. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada, por congelação, a uma temperatura de -80°C.

Os ensaios de susceptibilidade/resistência que recorreram à utilização de XTT foram realizados em placas de cultura celular de 96 poços com 200 µl de capacidade e as células foram quantificadas recorrendo a um leitor de microplacas (Dinex, MR133T).

Esta metodologia de contagem celular justifica a necessidade de determinar previamente a recta de calibração que traduz a actividade celular por reacção com o XTT seguindo-se a determinação da susceptibilidade ao metronidazol. A recta de calibração foi determinada utilizando suspensão celular de trofozoítos de *G. lamblia* em PBS com concentrações a variar entre 1×10^3 e 1×10^6 .

Nesta metodologia, após o período de incubação de 24 horas, com o fármaco em estudo, as culturas de *G. lamblia* foram analisadas recorrendo à utilização de XTT e as células foram posteriormente quantificadas utilizando um leitor de microplacas.

O ensaio por redução metabólica do XTT consistiu em transferir, para uma placa de cultura celular de 96 poços, suspensão celular (120 μ L) e solução de XTT/PMS (80 μ L), perfazendo um volume final de 200 μ L. As placas foram então incubadas a 37°C durante cerca de 4 horas.

Terminado o período de incubação, foi determinado o produto formado de formazam solúvel através de uma leitura imediata da absorvência a 450nm em leitor de microplacas.

Uma vez que o meio de cultura pode provocar a conversão espontânea dos sais tetrazolium (XTT) nos ensaios em que se recorreu à utilização de corantes ou fluorocromos procedeu-se previamente à remoção do meio de cultura re-suspendendo as células em PBS.

2.3.3 Diacetato de Fluoresceína (FDA)

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um fluorocromo que penetra nas células com membrana celular intacta (células viáveis), onde, por acção das esterases intracelulares, é hidrolisado a acetato e fluoresceína.

As propriedades fluorescentes da fluoresceína, produto da reacção ocorrida, permitem detectar a viabilidade celular uma vez que, quando expostas a uma radiação de 490nm, as células que acumulam a fluoresceína no seu interior, exibem uma fluorescência verde emitida a um comprimento de onda de 514nm (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch *et al.*, 1991).

A solução stock de FDA (Sigma) foi preparada por dissolução de 5 mg/mL em acetona. A solução foi entretanto esterilizada por filtração e armazenada, por

congelamento, a uma temperatura de -80°C . A solução de trabalho de FDA foi preparada através da adição de 0,04mL da solução stock de FDA com 10mL de PBS, numa preparação extemporânea (Jones & Senft, 1985).

Os ensaios de susceptibilidade/resistência que recorreram à utilização de FDA, foram realizados em microtubos e as células foram quantificadas recorrendo a um fluorímetro (JASCO, FP-6200).

Esta metodologia de contagem celular justifica a necessidade de determinar previamente a recta de calibração que traduz a actividade celular por reacção com o FDA seguindo-se a determinação da susceptibilidade ao metronidazol. A recta de calibração foi determinada utilizando suspensão celular de trofozoítos de *G. lamblia* em PBS com concentrações a variar entre 1×10^4 e 1×10^6 .

Nesta metodologia, após o período de incubação de 24 horas, com o fármaco em estudo, as culturas de *G. lamblia* foram analisadas recorrendo à utilização de FDA e as células foram posteriormente quantificadas utilizando um fluorímetro.

O ensaio recorrendo a FDA consistiu em transferir para cada microtubo suspensão celular (1 mL) e solução de FDA (0,5 mL), perfazendo um volume final de 1,5 mL. Após a adição de FDA, os microtubos foram incubados a 37°C durante cerca de 20 minutos.

Terminado o período de incubação as células viáveis foram determinadas recorrendo a um fluorímetro que permitiu, através da leitura da absorvência, quantificar a fluorescência emitida pelas células a um comprimento de onda de 514nm quando previamente expostas a 490nm.

2.3.4 Iodeto Propídio (PI)

O iodeto propídio (PI) é um fluorocromo utilizado para marcação do ADN, penetrando apenas nas células com membrana celular danificada e portanto consideradas não viáveis. A ligação deste composto aos ácidos nucleicos das células forma um complexo fluorescente que permite a sua detecção (Arguello-García *et al.*, 2004). Na presença de PI, as células não viáveis são portanto detectadas, uma vez que, quando expostas a uma radiação de 535nm, as células exibem uma fluorescência vermelha emitida a um comprimento de onda de 617nm (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch *et al.*, 1991).

A solução stock de PI (Sigma) foi preparada por dissolução de 5 mg em 50 mL de PBS. A solução foi entretanto esterilizada por filtração e armazenada no frio a uma temperatura de -80°C.

As soluções stock de ambos os fluorocromos (FDA e PI) são estáveis durante cerca seis meses, quando armazenados no escuro a 4°C.

A metodologia que recorre à utilização de PI é semelhante à metodologia descrita anteriormente para o FDA.

De notar que, uma vez que a utilização de PI permite identificar células não viáveis, a determinação da recta de calibração tem que ser realizada após a inactivação das células. Neste trabalho as células foram inactivadas por aquecimento a 56 °C durante cerca de 15m e posterior colocação em gelo (Sauch *et al.*, 1991).

Terminado o período de incubação com o PI as células não viáveis foram determinadas recorrendo a um fluorímetro que permitiu, através da leitura da absorvência, quantificar a fluorescência emitida pelas células a um comprimento de onda de 617nm quando previamente expostas a 535nm.

2.4. Tratamento Estatístico

Os diferentes ensaios tiveram como finalidade calcular a concentração de metronidazol que inibe 50% dos trofozoítos (IC₅₀) de isolados de *G. lamblia* (ATCC 30888), recorrendo as diferentes metodologias. A determinação da IC₅₀ foi realizada pela análise de Probit (Finney, 1977).

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente pela aplicação do teste estatístico para variáveis não paramétricas, de comparação de amostras independentes, Teste U de Mann-Whitney e do Teste da Mediana.

3. Resultados / Discussão

Vários são os fármacos actualmente disponíveis para o tratamento da giardiose, contudo, relatos cada vez mais frequentes de situações de resistência às terapêuticas implementadas, pondo em causa o sucesso do tratamento, têm vindo a justificar a necessidade de determinar o perfil de resistência/sensibilidade de *G. lamblia* aos fármacos habitualmente prescritos (Lemée *et al.*, 2000; Nash *et al.*, 2001; Upcroft & Upcroft, 2001; Abboud *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2003b; Arguello-García *et al.*, 2004).

O conhecimento do perfil de resistência deste parasita permitirá não só implementar terapêuticas adequadas, como também poderá constituir o ponto de partida na investigação de novas moléculas que assegurem o sucesso da terapêutica daquela que é considerada a mais frequente parasitose intestinal patogénica (Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006).

Este trabalho surgiu portanto pela necessidade de desenvolver e implementar uma metodologia que permita, de uma forma simples, rápida, eficaz e económica, determinar a sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* aos diferentes antiparasitários disponíveis. Além disso, e à semelhança do que já vem acontecendo com outros organismos, torna-se essencial padronizar uma metodologia, *in vitro*, que possa ser aplicada na avaliação de viabilidade deste parasita.

Neste sentido, ao longo do estudo, foram analisadas e comparadas quatro metodologias distintas concretamente, (1) metodologia de avaliação da perda de aderência (ADE), que constituiu o *gold standard* em ensaios de viabilidade celular com *G. lamblia*, e metodologias colirimétricas/fluorimétricas, com recurso ao (2) diacetato de fluoresceína (FDA), ao (3) iodeto de propídio (PI) e a um (4) derivado tetrazolium (XTT).

As diferentes metodologias foram aplicadas com o objectivo de avaliar, *in vitro*, a sensibilidade de trofozoítos de *G. lamblia* após exposição ao metronidazol, considerado o fármaco de eleição no tratamento da giardiose (Lemée *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2001; Arguello-García *et al.*, 2004; Upcroft *et al.*, 2006; Escobedo & Cimerman, 2007).

Nos diferentes ensaios foi determinada uma curva dose-resposta que relacionou a percentagem de inibição celular (%I) com as concentrações de metronidazol testadas (Figura 1). A inibição celular permitiu calcular a concentração inibitória 50 (IC₅₀), concentração de metronidazol que conduz à morte de 50% dos trofozoítos, utilizada neste estudo como parâmetro para comparar as metodologias em análise.

Em todos os ensaios observou-se uma relação directa entre a concentração de metronidazol e a percentagem de inibição obtida excepto na metodologia PI que apresentou resultados incongruentes, não justificando a continuidade dos ensaios. Nas restantes metodologias um aumento da concentração de metronidazol reflectiu, para as três metodologias agora em estudo (ADE, FDA e XTT), uma maior percentagem de inibição celular (%I) (Figura 1).

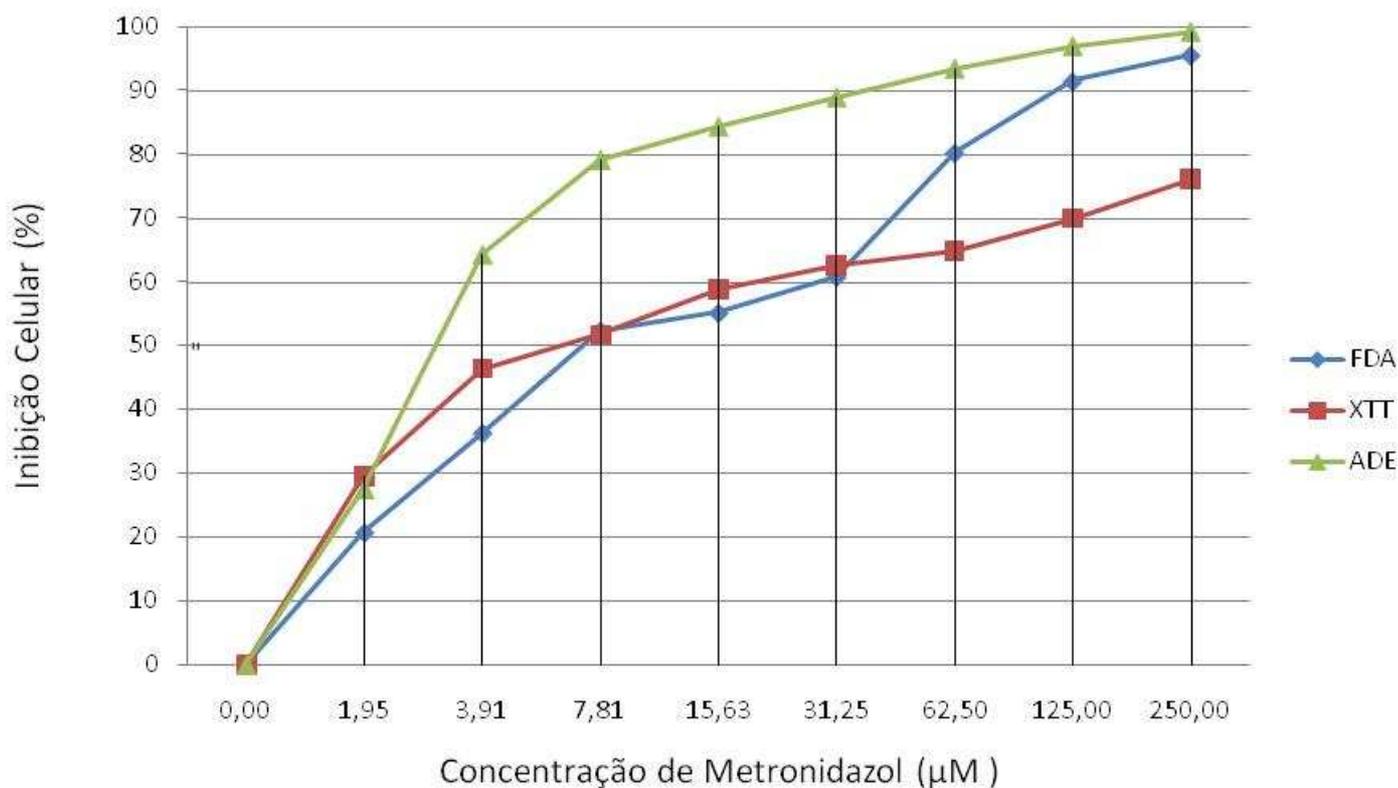


Figura 1. Curva dose-resposta de trofozoítos de *G. lamblia* obtida após exposição ao metronidazol, durante 24h, recorrendo à metodologia ADE, FDA e XTT.

A aderência dos trofozoítos de *G. lamblia* é um importante requisito para a patogenicidade da giardiose, uma vez que através da fixação à mucosa intestinal os trofozoítos não se encontram expostos ao efeito do peristaltismo intestinal que os arrastaria ao longo do intestino conduzindo à sua expulsão do organismo e consequente morte (Crouch *et al.*, 1990; Crouch *et al.* 1991; Favennec *et al.*, 1992; Farbey *et al.*, 1995; Ortega & Adam, 1997; Adam, 2001; Ordóñez, 2001).

Por este motivo a metodologia ADE é considerada por muitos autores uma boa opção quando se pretende avaliar a acção de fármacos anti-giardiais neste parasita (Pearce *et al.*, 1996; Ordóñez, 2001; Cruz *et al.*, 2003b).

Pelo facto de ser uma metodologia a que se recorre com frequência para avaliar a viabilidade de *G. lamblia* (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003a), a metodologia ADE foi, no presente estudo, considerada a metodologia de referência que permitiu comparar todas as metodologias em análise.

Apesar das vantagens apresentadas, nesta metodologia a contagem celular é efectuada recorrendo a um microscópio invertido e por isso dependente da distribuição homogénea das células aderentes na superfície e pressupõe que apenas as viáveis aderem (Ordóñez, 2001), o que a torna uma metodologia cansativa para o operador e associada a uma certa subjectividade (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003b).

De facto, uma das preocupações mais básicas de qualquer ensaio *in vitro* prende-se com a contagem dos trofozoítos que, quando realizada recorrendo ao microscópio, implica habitualmente demasiado trabalho, o que pode traduzir-se em ensaios demorados e pode conduzir a incorrecções na identificação/contagem das células. Além disso os ensaios são, na generalidade, realizados em tubos de cultura de grande volume, o que os torna dispendiosos (Beneré *et al.*, 2007).

Numa tentativa de ultrapassar estas limitações, foram desenvolvidos métodos alternativos que passam pela utilização de corantes (XTT) e/ou fluorocromos (FDA e PI) que, genericamente, permitem obter resultados mais rápidos e mais objectivos. Ambos se baseiam na determinação de mudanças de coloração e permitem que as células sejam quantificadas por espectrofotometria ou

espectrofluorometria, consoante recorram a corantes ou a fluorocromos, respectivamente.

Uma vez que se tratam de organismos microaerófilos (Brown *et al.*, 1998; Lane & Lloyd, 2002), a cultura de trofozoítos continua a ser uma dificuldade devido à necessidade de existir um ambiente reduzido em oxigénio, causando limitações práticas especialmente nas metodologias que recorrem à utilização de microplacas (Upcroft & Upcroft, 2001).

Para contrariar este inconveniente têm sido vários os autores a propor diferentes métodos incluindo incubação em câmaras modulares herméticas e banho de nitrogénio (Bell *et al.*, 1991), misturas de gás baixo em oxigénio (Adagu *et al.*, 2002) ou aplicação de sistemas comerciais *anaerocult* (Upcroft & Upcroft, 2001). Estudos desenvolvidos por Beneré *et al.* (2007), revelaram ainda que pode ser atingido um crescimento óptimo utilizando volumes próximos da capacidade do recipiente de cultura. Quando se utilizam microplacas é fundamental assegurar que a placa fica devidamente isolada, recorrendo por exemplo a *parafilme*. Além disso, é essencial um manuseamento cuidado das placas de forma a evitar contaminações (Bénére *et al.*, 2007).

Neste estudo o ambiente reduzido em oxigénio foi conseguido utilizando volumes próximos da capacidade do recipiente de cultura ou, no caso dos ensaios realizados em microplacas, recorrendo à utilização de sistemas comerciais *anaerocult*, concretamente, Anaerocult[®]C (Merck).

O PI é um fluorocromo que se caracteriza por penetrar nas células não viáveis ligando-se aos ácidos nucleicos. Os resultados discordantes obtidos quando se recorre a esta metodologia podem ser explicados pelo facto das células terem sido previamente expostas ao metronidazol. A exposição das células a compostos que actuem provocando danos no DNA, como é o caso do metronidazol, podem alterar a ligação que se estabelece entre o PI e o DNA conduzindo a interpretações erróneas de viabilidade celular (Krishan *et al.*, 1978; Alabaster *et al.*, 1978; Alabaster *et al.*, 1979; Hamilton *et al.*, 1980).

Os resultados registados permitiram observar que a utilização de metronidazol inviabiliza o recurso ao PI como forma de avaliar a viabilidade celular, contrariamente ao que acontece no estudo realizado por Arguello-García *et al.* (2004). Os valores incongruentes não justificam, portanto, a continuidade dos ensaios recorrendo a este fluorocromo.

Não obstante, a utilização de PI, parece ser uma alternativa que permitirá, à semelhança de outros fluorocromos, avaliar de forma rigorosa e útil a sensibilidade de *G. lamblia* a fármacos antiparasitários que não actuem ao nível do DNA.

No seguimento do exposto pode concluir-se que a selecção do melhor método a aplicar como forma de avaliar a sensibilidade de *G. lamblia*, deve sempre ter em conta o mecanismo de actuação do fármaco em estudo.

Ao contrário do que acontece com o PI, o FDA e o XTT são compostos que permitem identificar células metabolicamente activas, em que a coloração, registada pela leitura da respectiva absorvência, traduz a intensidade da reacção ocorrida nas células, reflectindo a sua viabilidade.

Fazendo uma análise das três metodologias (Tabela 1), constata-se que as metodologias que recorreram à utilização de fluorocromos ou corantes apresentaram valores de IC₅₀ mais próximos, 9,87 µM e 8,93 µM, para o FDA e XTT, respectivamente. No que concerne à metodologia de referência (ADE), verifica-se que os valores de IC₅₀ são cerca de três vezes inferiores aos obtidos pelas restantes metodologias. Estes resultados revelam a proximidade entre a metodologia FDA e a metodologia XTT.

O valor de IC₅₀ obtido, recorrendo à metodologia ADE, foi de 2,99 µM (Tabela 1) o que vai de encontro aos resultados alcançados no estudo desenvolvido por Cruz *et al.*, (2003a) em que, para o mesmo isolado (ATCC 30888) e com base na mesma metodologia, obteve um IC₅₀ de 3,10 µM.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ determinados para o isolado de *G. lamblia* (ATCC 30888) após exposição a diferentes concentrações de metronidazol por um período de 24 horas obtidos segundo a metodologia ADE, FDA e XTT.

METODOLOGIAS	METRONIDAZOL (µM)	
	IC ₅₀ (Valores Médios)	Intervalo de Confiança (95%)
ADE	2,99	2,98509815 < ED50 < 2,99470863
FDA	9,87	9,85539938 < ED50 < 9,87638914
XTT	8,93	8,88706154 < ED50 < 8,96973243

Quando analisadas em conjunto, através da comparação da IC₅₀ obtida, não é possível concluir que as três metodologias em estudo são comparáveis (*Teste da Mediana, p-value*<0,05) (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos valores obtidos da IC₅₀ para as três metodologias em análise (ADE, FDA e XTT) para o isolado de *G. lamblia* (ATC 30888) após a exposição a diferentes concentrações de metronidazol por um período de 24 horas. A análise foi feita pela aplicação do Teste da Mediana.

COMPARAÇÃO METODOLOGIAS	Teste da Mediana
	<i>p-value</i>
ADE vs FDA vs XTT	0,18

Fazendo uma comparação duas a duas, ADE vs FDA e ADE vs XTT, não é possível concluir que as metodologias em análise são comparáveis (*Teste U de Mann-Whitney, p-value*<0,05). Pelo Contrário, é possível observar que, quando analisadas em conjunto, as metodologias FDA e XTT apresentaram resultados comparáveis (*Teste U de Mann-Whitney, p-value*>0,05), o que revela que estas são as metodologias que mais se aproximam em termos de valores obtidos de IC₅₀ (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação dos valores obtidos de IC₅₀ para as três metodologias em análise (ADE, FDA e XTT), analisando duas a duas, para o isolado de *G. lamblia* (ATC 30888) após a exposição a diferentes concentrações de metronidazol por um período de 24 horas. A análise foi feita pela aplicação do Teste estatístico para variáveis não paramétricas, Teste U de Mann-Whitney.

COMPARAÇÃO METODOLOGIAS	Teste U de Mann-Whitney
	<i>p-value</i>
ADE vs FDA	0,0012
ADE vs XTT	0,0012
FDA vs XTT	1

Quando comparados com a metodologia ADE, os valores mais elevados da IC₅₀ obtidos pelas metodologias FDA e XTT, podem ser explicados pela possibilidade de ocorrência de falsos positivos. Este acontecimento assume particular interesse se pensarmos que as células foram previamente expostas ao metronidazol, um fármaco antiparasitário que actua por ligação às moléculas de DNA causando perda da sua estrutura helicoidal e quebra das cadeias o que irá comprometer a capacidade de divisão das células. Embora sem capacidade proliferativa, e portanto não viáveis, as células podem no entanto manter actividade metabólica, pelo que, inadvertidamente, serão consideradas células viáveis uma vez que, também elas, irão apresentar coloração quando expostas ao FDA/XTT. Este facto poderá enviesar os resultados e ser responsável por valores mais elevados de células consideradas viáveis, quando na realidade não o são.

Relativamente à metodologia XTT os valores de IC₅₀ obtidos são comparáveis a outros estudos desenvolvidos com o mesmo corante (Arguello-García, *et al.*, 2004; Bénéré, *et al.*, 2007).

Ao contrário do MTT, derivado tetrazolium igualmente utilizado como forma de avaliar a viabilidade celular, o XTT apresenta como vantagem o facto de não formar um composto insolúvel permitindo uma leitura imediata da mistura após reacção com o corante, além disso é mais barato quando comparado ao MTT.

Uma limitação prática na utilização do XTT em testes de viabilidade de *G. lamblia* diz respeito ao facto do meio de cultura reduzir espontaneamente estes substratos, devido à presença de agentes redutores como ácido ascórbico, L-cisteína ou extracto de levedura (Bénére, 2007). Neste sentido, sempre que o meio de cultura pudesse comprometer um ensaio, procedeu-se previamente à sua remoção re-suspendendo os trofozoítos em PBS.

De todas as metodologias em análise, a metodologia ADE parece ser a mais dispendiosa, uma vez que não permite fazer os ensaios em microescala e implica uma maior dependência do operador na contagem celular o que a torna uma metodologia mais cansativa e porventura mais demorada e onde os resultados podem estar associados a uma certa subjectividade.

Não obstante, esta metodologia é considerada por muitos autores de execução simples, relativamente rápida e sensível, que não envolve corantes/fluorocromos nem equipamentos complexos e que apresenta resultados rigorosos e fiáveis, o que torna este método uma boa opção quando se pretende avaliar a acção de fármacos anti-giardiais (Pearce *et al.*, 1996; Ordóñez, 2001; Cruz *et al.*, 2003b).

As metodologias que recorrem à utilização de corantes ou fluorocromos são as que garantem um maior rigor aquando da contagem celular recorrendo a um leitor de microplacas ou a um fluorímetro.

Estas técnicas de contagem celular permitem obter resultados mais objectivos, não sujeitos à subjectividade do operador e por isso mais rigorosos. Além disso permitem realizar ensaios em microescala, através da utilização de microplacas, o que as torna muito atractivas, transformando-se numa boa alternativa quando se pretende desenvolver metodologias de baixo custo. São de simples execução e permitem obter resultados relativamente rápidos. Constituem metodologias mais autónomas e menos cansativas para o operador, no que respeita à contagem celular.

Das metodologias em análise, o XTT é o que necessita de maior tempo de incubação (cerca de 4 horas) e é também um reagente mais dispendioso, quando comparado ao FDA.

A grande limitação à utilização de fluorocromos reside na necessidade de existir um fluorímetro que permita efectuar a contagem celular. Este equipamento implica um grande investimento e que nem sempre está disponível em todos os laboratórios, ao contrário de um leitor de microplacas que permite a realização de contagem celular recorrendo a corantes e que se encontra disponível com mais facilidade em contextos laboratoriais.

Assim, além de ter em conta o mecanismo de actuação do fármaco em estudo, a selecção da melhor metodologia deve ter em conta a disponibilidade de equipamentos necessários à execução das diferentes metodologias.

No futuro será necessário efectuar mais ensaios de viabilidade celular com *G. lamblia* que permitam determinar a relação existente entre as diferentes metodologias tornando possível, de uma forma rigorosa, comparar a metodologia de referência (ADE) com metodologias alternativas que recorrem à utilização de corantes ou fluorocromos (XTT, FDA).

O conhecimento do perfil de resistência deste parasita permitirá não só implementar terapêuticas adequadas, como também poderá constituir o ponto de partida na investigação de novas moléculas que assegurem o sucesso da terapêutica daquela que é considerada a mais frequente parasitose intestinal patogénica (Gardner & Hill, 2001; Savioli *et al.*, 2006; Hausen *et al.*, 2006).

4. Referências Bibliográficas

- Abboud, P., Lemée V., Gargala G., Basseur P., Ballet J. J., Borsa-Lebas F., Caron F. & Favennec L.** 2001. Successful treatment of Metronidazol-and Albendazole-resistance Giardiasis with Nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1792-1794.
- Adagu, I. S.; Nolder, D.; Warhurst, D. C. & Rossignol. J. F.** 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother.* **49(1)**:103-11.
- Adam, R. D.** 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.
- Alabaster, O., Magrath, I. T., Habbersett, M.C. & Herman, C.J.** 1979. Effects of cyclophosphamide on the mithramycin – DNA fluorescence of human lymphoma cells: A possible result of guanine alkylation. *The Journal of Histochemistry and cytochemistry.* **27(1)**:500-504
- Alabaster, O., Tannenbaum, E., Habbersett, M.C. Magrath, I., & Herman, C.** 1978. Drug-induced changes in DNA fluorescence intensity detected by flow microfluorometry and their implications for analysis of DNA content distributions. *Cancer research.* **38**:1031-1035.
- Ali, V. & Nozaki, T.** 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev.* **20(1)**:164-87.
- Arguello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres, G.** 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.
- Bell, C. A., Cory, M., Fairley, T. A., Hall, J. E. & Tidwell, R. R.** 1991. Structure-activity relationships of pentamidine analogs against *Giardia lamblia* and correlation of anti-giardial activity with DNA-binding affinity. *Antimicrob Agents Chemother.* **35(6)**:1099-107.
- Bénére, E., da Luz, R. A., Vermeersch, M., Cos, P. & Maes, L.** 2007. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods.* **71(2)**:101-6.
- Brown, D. M., Upcroft, J. A., Edwards, M. R. & Upcroft, P.** 1998. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **241**:155-161.
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M., Smith, S. E. & Thong, Y. H.** 1991. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:375-379.

- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M. & Thong, Y. H.** 1990. Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:246-248.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Leite, E., Sousa, J. C. F. & Cabral, M.** 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Silva, M. C., Sousa, J. C. F., Manso, O. & Cabral, M.** 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.
- Escobedo, A. A. & Cimerman, S.** 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother.* **8(12)**:1885-902.
- Farbey, M. D., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C.** 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol.* **25(5)**:593-599.
- Farthing, M.** 1996. Giardiasis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25**:493-515.
- Favennec, L., Chochillon, C., Magne, D., Meillet, D., Raichvarg, D., Savel, J. & Gobert, J. G.** 1992. A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cells. *Parasitol Res.* **78(1)**:80-1.
- Finney, D.** 1977. *Probit analysis*. New York, Cambridge. University Press.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R.** 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.
- Hamilton, V. T., Habbersett, M. C., Herman, C. J.** 1980. Flow microfluorometric analysis of cellular DNA: Critical comparison of mithramycin and propidium iodide. *J Histochem Cytochem.* 1980 **28(10)**:1125-8.
- Harris, J. C., Plummer, S. & Lloyd D.** 2001. Anti-giardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.
- Hausen, M. A., Freitas, J. C. Jr & Monteiro-Leal, L. H.** 2006. The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol.* **113(3)**:135-41.
- Jones K. H. & Senft J. A.** 1985. An Improved Method to determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal Of Histochemistry and Cytochemistry*, **(33) 1**: 77-79.
- Keister, D.** 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**:487-488.

- Krishan, A., Ganapathi, R. N. & Israel, M.** 1978. Effect of adriamycin and analogs on the nuclear fluorescence of propidium iodide-stained cells. *Cancer Res.* **38 (11 Pt 1)**:3656-62.
- Lane, S. & Lloyd, D.** 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol.* **28(2)**:123-47.
- Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet, J. J. & Favennec, L.** 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *JAC.* **46**:819-821.
- Meloni, B., Thompson, R., Reynoldson, J. & Seville, P.** 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.
- Meyer, E. A.** 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol.* **27**:179-183.
- Morgan, U. M., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. A.** 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.
- Nash, T. E., Christopher, A. O., Thomas, E., Subramanian, G., Keiser, P. & Moore, T. A.** 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin. Infect. Dis.* **33**:22-28.
- Ordóñez, M. G.** 2001. Ensayos Farmacológicos *in vitro* para evaluar actividad anti-giardiasis. *Rev Cubana Farm;* **35(1)**:66-73.
- Ortega, Y. R. & Adam, R. D.** 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.
- Pearce, D., Reynoldson, J. & Thompson, R.** 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.
- Sauch, J. F., Flanigan, D., Galvin, M. L., Berman, D. & Jakubowski, W.** 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **57(11)**:3243-7.
- Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A.** 2006. *Giardia* and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* **22(5)**:203-8.
- Schupp, D. G. & Erlandsen, S. L.** 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* **53(4)**:704-7.
- Tessier J. L. & Davies G. A. L.** 1999. Giardiasis. Primary Care Update. **6**:1-4.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*. **14**:150-164.

Upcroft, J. A., Dunn, L. A., Wright, J. T., Benakli, K., Upcroft, P & Vanelle, P. 2006. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **50** (1):344-7.

Valdez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Navarrete-Vázquez, G., Tapia, A., Cortés, R., Hernández, M. & Castillo, R. 2002. Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. **12**(16):2221-4.

Wright, C. W., Melwani, S., Phillipson, J. D. & Warhurst, D. C. 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Wright, J. M., Dunn L. A., Upcroft, P. & Upcroft, J. A. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* **2**(6):529-5541.

Capítulo V
Discussão Geral

Discussão Geral

São muitos os estudos publicados com o objectivo de avaliar a viabilidade de *Giardia lamblia* a diferentes substâncias, debruçando-se alguns deles na avaliação da sensibilidade deste parasita a diferentes antiparasitários. Contudo, na sua maioria, os diferentes estudos reflectem investigações que têm como finalidade avaliar a sensibilidade dos quistos de *Giardia lamblia*, sendo reduzidos os que avaliam a sensibilidade dos trofozoítos aos fármacos habitualmente prescritos (Arguello-García *et al.*, 2004; Bénéré *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 1992).

Constituindo os trofozoítos de *Giardia lamblia* a forma responsável pela doença, colonizando o intestino delgado do hospedeiro (Bingham & Meyer, 1979; Adam, 2001; Tessier & Davies, 1999), torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam avaliar de forma rápida, eficaz e pouco dispendiosa a sensibilidade de *Giardia lamblia* aos fármacos usados no combate a esta parasitose.

O desenvolvimento de metodologias que permitam avaliar a sensibilidade de *Giardia lamblia* aos fármacos antiparasitários são uma mais valia, uma vez que permitem comprovar a existência, ou não, de isolados resistentes, contribuindo de forma decisiva, não só para definir o nível de resistência das estirpes que infectam a população humana, como também pode ser considerado um ponto de partida em investigações que tenham como objectivo estudar os diferentes mecanismos que estão na origem das resistências detectadas (Majewska *et al.*, 1991; Townson *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993).

O conhecimento de resistências é um passo determinante no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Estudos contínuos no sentido de desenvolver mais e melhores tratamentos da giardiose recorrendo a novos agentes antiparasitários e a avaliação da resistência aos agentes tradicionais, estão portanto dependente de ensaios que avaliem a viabilidade dos trofozoítos após exposição a várias concentrações do agente antiparasitário em estudo.

O presente trabalho de investigação teve como finalidade comparar diferentes metodologias que permitem avaliar a sensibilidade de trofozoítos de *Giardia lamblia* ao metronidazol, fármaco frequentemente prescrito no tratamento da giardiose (Boreham *et al.*, 1985; Gordts *et al.*, 1985; Crouch *et al.*, 1986; Upcroft & Upcroft, 1993; Freeman *et al.*, 1997; Gardner & Hill, 2001; Mineno e Avery, 2003; Arguello-García *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2001; Farbey *et al.*, 1995).

Após exposição ao fármaco em estudo, a viabilidade de *G. lamblia* foi avaliada, *in vitro*, decorridas 24 horas, por diferentes metodologias que se basearam em parâmetros fisiológicos (aderência das células às paredes do tubo de cultura) e parâmetros bioquímicos (actividades enzimáticas e outras metodologias colorimétricas) (Arguello-García, *et al.*, 2004).

Os diferentes ensaios de sensibilidade permitiram testar quatro metodologias distintas, concretamente: (1) metodologia de avaliação da perda de aderência (ADE), e metodologias fluorimétricas e colorimétricas, com recurso ao (2) diacetato de fluoresceína (FDA), ao (3) iodeto de propídio (PI) e a um (4) derivado tetrazolium (XTT).

Por representar a metodologia a que se recorre com mais frequência para avaliar a viabilidade da *Giardia lamblia* (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001), a metodologia que se baseia na perda da capacidade de aderência dos trofozoítos à superfície de plástico do suporte de cultura (ADE), será, neste estudo, considerada a metodologia de referência.

Nos diferentes ensaios foi obtida uma curva dose-resposta que pretende reflectir a percentagem de inibição celular (%I) obtida para cada dosagem de metronidazol em estudo. A partir das diferentes percentagens de inibição celular (%I) foram calculadas, para cada ensaio, a respectiva concentração inibitória 50 (IC₅₀), utilizando a análise de Probit (Finney, 1977).

A concentração inibitória 50 (IC₅₀) corresponde à concentração de metronidazol que conduz à morte de 50% das células. Neste estudo, a IC₅₀ foi considerado o parâmetro que permitiu comparar as diferentes metodologias em análise, bem como comparar com trabalhos desenvolvidos por outros autores.

Importa referir que, investigações realizadas por Arguello-García, *et al.*, (2004) permitiram observar que, ainda que mantendo as mesmas condições no estudo, e aplicando a mesma metodologia de avaliação de viabilidade, diferentes isolados de *Giardia lamblia* (ATCC # 30888 e ATCC # 30957) comportaram-se de forma muito distinta, quando expostas ao fármaco em estudo, obtendo-se valores de IC₅₀ diferentes, pelo que, a comparação dos resultados obtidos com estudos realizados em diferentes isolados de *G. lamblia* deverá ser feita com prudência.

Analisando isoladamente cada metodologia foi possível observar que, exceptuando-se os valores obtidos para o PI, todos as outras exibem um comportamento coerente. Em todas as metodologias um aumento da dosagem de metronidazol conduziu a um aumento da percentagem de inibição obtida.

Como foi já, oportunamente, referido o PI é um corante/fluorocromo que se liga aos ácidos nucleicos de cadeia longa intercalando-se entre as bases, e que apresenta pouca ou mesmo nenhuma afinidade para sequências específicas. Apenas as células com membrana celular alterada (não viáveis), conseguem incorporar este composto no seu DNA. Estas células são quantificadas, uma vez que, quando expostas a uma radiação de 535nm, as células exibem uma fluorescência vermelha emitida a um comprimento de onda de 617nm (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch *et al.*, 1991).

É no entanto concebível que a exposição das células a outros agentes que se intercalam com o DNA possam alterar a ligação que se estabelece entre o PI e o DNA conduzindo a interpretações erróneas de viabilidade celular. Na verdade, são vários os estudos que apontam os agentes quimioterápicos e outras substâncias químicas como responsáveis por afectar a ligação deste fluorocromo ao DNA de tal forma que dificulta e/ou invalida a interpretação dos resultados (Krishan *et al.*, 1978; Alabaster *et al.*, 1978; Alabaster *et al.*, 1979; Hamilton *et al.*, 1980).

No presente estudo, os resultados incongruentes obtidos quando se recorre à metodologia PI podem ser explicados pelo facto das células terem, previamente, estado expostas ao metronidazol.

Este fármaco interacciona com o DNA ligando-se, de forma covalente, às suas macromoléculas o que causa a perda da sua estrutura helicoidal, quebra das cadeias e conseqüente inibição da síntese de ácido nucleico provocando a morte dos trofozoítos (Edwards, 1993; Borst & Ouellette, 1995; Freeman *et al.*, 1997; Upcroft e Upcroft, 1998; Gardner e Hill, 2001; Campanati & Monteiro-Leal, 2002).

Os danos no DNA, resultantes da acção do metronidazol, inviabilizam assim a metodologia que teria como objectivo avaliar a viabilidade de trofozoítos de *Giardia lamblia* a este fármaco, recorrendo ao PI.

Excluindo a metodologia PI, todas as outras mostraram ser metodologias sensíveis e rigorosas para avaliar a viabilidade dos trofozoítos de *Giardia lamblia*, quando expostos ao metronidazol.

A metodologia ADE foi, no presente estudo, a metodologia de referência que permitiu comparar todas as metodologias em análise. A escolha desta metodologia deve-se, não só ao facto de ser uma metodologia a que se recorre com frequência para avaliar a viabilidade de *Giardia lamblia* (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003a) mas também pelo facto desta metodologia de avaliação de viabilidade ter como base a inibição da aderência destes parasitas. A aderência que é uma das principais características dos trofozoítos de *G. lamblia* (Ortega & Adam, 1997; Adam, 2001), sendo considerado por Crouch *et al.*, (1990) um importante requisito para a patogenicidade da parasitose, através da fixação à mucosa intestinal, e sem a qual se encontrariam expostos ao efeito do peristaltismo intestinal que os arrastaria ao longo do intestino conduzindo à sua expulsão do organismo e conseqüente morte (Crouch *et al.*, 1990; Crouch *et al.* 1991; Favennec *et al.*, 1992; Farbey *et al.*, 1995; Ordoñez, 2001).

Por se basear na aderência dos trofozoítos à superfície do suporte de cultura (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990; Upcroft & Upcroft, 2001), na metodologia ADE, a contagem celular recorrendo a um microscópio invertido, depende da distribuição homogénea das células aderentes na superfície e pressupõe que apenas as viáveis aderem (Ordoñez, 2001), encontrando-se sempre associada a uma certa subjectividade na selecção dos campos a considerar para a realização das contagens (Meyer, 1970; Meloni *et al.*, 1990;

Upcroft & Upcroft, 2001; Cruz *et al.*, 2003a). Não obstante, a metodologia ADE é, considerada por muitos autores, uma metodologia de execução simples, relativamente rápida, sensível, que não envolve corantes nem equipamentos complexos e que apresenta resultados rigorosos e fiáveis, o que torna este método uma boa opção quando se pretende avaliar a acção de fármacos anti-giardiais, como é o caso do metronidazol (Cruz *et al.*, 2003b; Pearce *et al.*, 1996; Upcroft & Upcroft, 2001; Ordoñez, 2001; Pearce *et al.*, 1996; Cruz *et al.*, 2003b).

O valor de IC₅₀ obtido no presente estudo, recorrendo à metodologia ADE, foi de 2,98990µM o que vai de encontro aos resultados alcançados no estudo desenvolvido por Cruz *et al.*, (2003a) em que, para o mesmo isolado (ATCC 30888) e com base na mesma metodologia, se obteve um IC₅₀ de 3,10µM.

Com o objectivo de comparar duas das metodologias mais frequentemente utilizadas para avaliar a viabilidade da *Giardia lamblia* a fármacos antiparasitários, como sejam a *Inibição da Aderência dos Trofozoítos* e a *Inibição da Capacidade de Multiplicação dos Trofozoítos*, o estudo realizado por Cruz *et al.*, (2003b) revelou que as duas metodologias apresentam resultados muito semelhantes. De acordo com o mesmo estudo, as conclusões registadas apenas se aplicam quando se pretende avaliar a viabilidade deste parasita a fármacos com um mecanismo de actuação similar ao do metronidazol. Refira-se que, quando o objectivo é estudar/avaliar o efeito de concentrações inibitórias elevadas (IC₉₀ ou a concentração mínima letal), as duas metodologias apresentaram resultados distintos (Cruz *et al.*, 2003b).

No seguimento do exposto, e assumindo que os resultados obtidos pela metodologia que avalia a *Inibição da Aderência dos Trofozoítos* (ADE) são comparáveis aos obtidos pela metodologia que avalia a *Capacidade de Multiplicação dos Trofozoítos*, o valor da IC₅₀ aqui obtido (2,98990 µM) foi cerca de quatro vezes superior ao valor obtido por Arguello-García, *et al.*, (2004).

Recorrendo a várias metodologias para determinar a susceptibilidade da *Giardia lamblia* quando exposta a diferentes antiparasitários, Arguello-García, *et al.*, (2004), obteve um IC₅₀ de 0,7µM, quando avaliou, *in vitro*, a viabilidade deste parasita ao metronidazol, pela perda da *Capacidade de Multiplicação dos Trofozoítos*.

Fazendo uma análise das três metodologias, constata-se que as metodologias que recorreram à utilização de fluorocromos ou corantes apresentaram valores de IC_{50} mais próximos, 9,87 μ M e 8,93 μ M, para o FDA e XTT, respectivamente. No que concerne à metodologia de referência (ADE), verifica-se que os valores de IC_{50} são cerca de três vezes inferiores aos obtidos pelas restantes metodologias. Estes resultados revelam a proximidade entre a metodologia FDA e a metodologia XTT.

Quando analisadas em conjunto, através da comparação da IC_{50} obtida, não é possível concluir que as três metodologias em estudo são comparáveis (*Teste da Mediana, p-value*<0,05).

Fazendo uma comparação duas a duas, ADEvsFDA e ADEvsXTT, não é possível concluir que as metodologias são comparáveis (*Teste U de Mann-Whitney, p-value*<0,05). Pelo contrário, é possível observar que, as metodologias FDA e XTT apresentaram resultados comparáveis (*Teste U de Mann-Whitney, p-value*>0,05), o que revela que estas são as metodologias que mais se aproximam em termos de valores obtidos de IC_{50} .

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto apolar, característica que lhe permite facilmente transpor a membrana celular. Uma vez no meio intracelular, o FDA é hidrolisado no citoplasma, por acção das esterases intracelulares não específicas, a acetato e fluoresceína (Rotman et al, 1966; Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Prudêncio et al., 2002).

A fluoresceína, produto da reacção ocorrida, é um composto polar ficando facilmente retido no interior da célula. As propriedades fluorescentes da fluoresceína, produto da reacção ocorrida, permitem detectar a viabilidade celular uma vez que, quando expostas a uma radiação de 490nm, as células que acumulam a fluoresceína no seu interior, exibem uma fluorescência verde emitida a um comprimento de onda de 514nm (Schupp & Erlandsen, 1987; Sauch et al., 1991).

Num estudo que tinha como objectivo determinar a viabilidade de quistos de Giardia, Schupp & Erlandsen (1987) descreveram que a fluoresceína se acumulava tanto entre a parede interna do quisto e a membrana do trofozoíto como também no citoplasma do próprio trofozoíto. Esta observação permitiu concluir que, além da parede celular do quisto, também a membrana celular do trofozoíto funciona como barreira à difusão da fluoresceína para fora da célula (Schupp & Erlandsen, 1987). Os resultados reforçaram a ideia de que a utilização de FDA é um bom método para avaliar a viabilidade celular, quer de quistos quer de trofozoítos de Giardia lamblia.

A acumulação de fluoresceína no interior dos trofozoítos reflecte assim a integridade da membrana celular traduzindo-se a sua viabilidade através da fluorescência apresentada pela célula (FDA+). As células que apresentam danos na sua membrana, e portanto células não viáveis, não terão capacidade de reter a fluoresceína no seu interior, não apresentando fluorescência (FDA-) (Rotman et al, 1966; Schupp & Erlandsen, 1987).

De facto, como foi já referido, no presente estudo a fluorescência apresentada pelas células quando expostas ao FDA diminui no sentido inverso à concentração de metronidazol testada. Ou seja, um aumento na concentração de metronidazol traduz-se numa acção mais agressiva às células o que conduz a um aumento de células não viáveis e por isso impossibilitadas de reter o fluorocromo no seu interior, justificando a diminuição da fluorescência registada.

Na sequência do exposto a detecção de células com fluorescência verde está deste modo dependente da integridade da membrana celular, que permita uma acumulação de fluoresceína no interior da célula, bem como da existência de actividade esterásica, necessária à conversão do diacetato de fluoresceína em fluoresceína.

Na avaliação da viabilidade celular, recorrendo ao FDA, as células são consideradas viáveis quando apresentam fluorescência verde (FDA+), que por sua vez está condicionada aos dois pressupostos atrás referenciados.

Pode acontecer no entanto que, células que já tenham perdido a sua capacidade proliferativa, e portanto células não viáveis, apresentem ainda actividade esterásica e mantenham ainda a integridade da sua membrana, pelo

que, inadvertidamente, serão consideradas células viáveis uma vez que, também elas, irão apresentar-se com fluorescência. Este acontecimento poderá enviesar os resultados e ser responsável por valores mais elevados de células consideradas viáveis, quando na realidade não o são (falsos positivos).

A ocorrência de falsos positivos assume particular interesse se pensarmos que as células foram previamente expostas ao metronidazol, um fármaco antiparasitário que actua por ligação às moléculas de DNA causando perda da sua estrutura helicoidal e quebra das cadeias o que irá comprometer a capacidade de divisão das células. Embora sem capacidade proliferativa, e portanto, não viáveis, as células podem ainda manter as membranas intactas e actividade esterásica apresentando por este motivo fluorescência quando expostas ao FDA.

O maior número de células viáveis contabilizadas irá traduzir-se em valores mais elevados da IC_{50} , quando comparada com a obtida por outras metodologias. De facto, analisando os resultados recolhidos é possível observar que na metodologia que recorre ao FDA se registou um valor da IC_{50} cerca de três vezes superior ao obtido com a metodologia de referência ADE.

Habitualmente o FDA é um composto utilizado para avaliar a viabilidade celular da *Giardia lamblia* em simultâneo com o PI (Jones & Senft, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987; Arguello-García et al. 2004). Contrariamente ao FDA, o PI apenas tem capacidade de penetrar nas células com as membranas celulares danificadas.

Ensaio que envolvam o recurso a sais tetrazolium, como a utilização do XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilaminocarbonil-tetrazolium)] são outra alternativa quando se pretende avaliar a viabilidade celular. Os sais tetrazolium apresentam cor amarela e penetram rapidamente nas células intactas e nas membranas dos componentes celulares, como as mitocôndrias. No interior das células metabolicamente activas o XTT é reduzido a formazan pelas desidrogenases mitocondriais. Os cristais de formazan, produto resultante da conversão do XTT, apresentam coloração púrpura que pode ser quantificada por espectrofotometria a 450nm (Wright *et al.*, 1992).

A coloração registada traduz assim a intensidade da reacção ocorrida nas células com actividade metabólica, reflectindo a sua viabilidade. Ou seja, as células são consideradas viáveis quando apresentam cor púrpura após exposição ao XTT.

No estudo desenvolvido, e à semelhança do que acontece com o FDA, também o recurso ao XTT permitiu verificar uma relação directa entre a coloração apresentada pelas células e o número de células viáveis. Assim, e avaliando a viabilidade celular após exposição ao metronidazol, pode concluir-se que um aumento da concentração deste fármaco conduziu a um aumento de células não viáveis que se traduziu numa diminuição da coloração registada.

Como foi já referido, e pela observação dos resultados obtidos por Arguello-García, et al., (2004), o comportamento de diferentes isolados de *Giardia lamblia* após exposição ao metronidazol e recorrendo à mesma metodologia de avaliação de viabilidade celular, mostrou ser desigual. Neste sentido, a análise das metodologia, concretamente no que respeita à IC₅₀, deverá ser efectuada por comparação de isolados iguais de *Giardia lamblia* (Arguello-García, et al., 2004).

Num estudo que permitiu comparar diferentes métodos de avaliação da sensibilidade de *Giardia lamblia*, recorrendo a sais tetrazolium (XTT e MTT), após exposição ao metronidazol, Bénéré, et al., (2007) obteve um valor superior de IC₅₀ para a metodologia MTT. Registou-se, para o isolado ATCC 30957, um IC₅₀ de 5,50µM e de 2,67µM, quando se recorreu ao MTT e ao XTT, respectivamente.

A comparação das duas metodologias que recorrem a sais tetrazolium (XTT e MTT), realizada por Bénéré, et al., (2007), ainda que com um isolado diferente, é relevante uma vez que permite ter uma noção do comportamento dos isolados de *Giardia lamblia* face a estes compostos (XTT vs MTT).

A investigação desenvolvida por Arguello-García, et al., (2004) permitiu observar o comportamento dos isolados ATCC30888 e ATCC30957. Quando expostos ao metronidazol, e recorrendo à metodologia MTT, os isolados em análise exibiram um IC₅₀ de 38,9µM e de 74,7µM, para o isolado ATCC30957 e ATCC30888, respectivamente.

Neste estudo Arguello-García, *et al.*, (2004) não recorreu à utilização de XTT, contudo, e com base nos resultados de Bénéré, *et al.*, (2007), é possível prever que, para ambos os isolados, os resultados obtidos utilizando XTT seriam inferiores aos obtidos com o MTT.

No seguimento do exposto, os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por Arguello-García, *et al.*, (2004), uma vez que, para o mesmo isolado (ATCC30888) e recorrendo à metodologia XTT, foi obtido um IC₅₀ de 8,92830µM, valor inferior ao obtido por Arguello-García, *et al.*, (2004) que recorrendo à metodologia MTT obteve um IC₅₀ de 74,7µM.

Assim, e tendo por base os resultados obtidos por Bénéré, *et al.*, (2007), para o mesmo isolado (ATCC30888) foi um obtido um IC₅₀ inferior quando se recorreu à metodologia XTT.

Na sequência do exposto, os valores mais elevados da IC₅₀ obtidos pelas metodologias FDA e XTT podem ser explicados pelo facto das células manterem a sua actividade metabólica o que pode enviesar os resultados e ser responsável por valores mais elevados de células consideradas viáveis.

De todas as metodologias em análise, e ao contrário das metodologias que recorrem à utilização de corantes ou fluorocromos, a metodologia ADE parece ser a mais dispendiosa, pois não permite fazer ensaios em microescala e implica uma maior dependência do operador na contagem celular o que a torna uma metodologia mais demorada e onde os resultados podem estar associados a uma certa subjectividade.

Uma vez que recorrem utilizam leitores de microplacas ou fluorímetros, a metodologia XTT e FDA, garantem um maior rigor aquando da contagem celular, permitindo obter resultados mais objectivos e por isso mais rigorosos. Das metodologias em análise, o XTT é o que necessita de maior tempo de incubação e é o reagente mais dispendioso. A grande limitação à utilização de fluorocromos reside na necessidade de existir um fluorímetro que permita efectuar a contagem celular. Este equipamento implica um grande investimento e nem sempre está disponível em todos os laboratórios.

Assim, Além de ter em conta o mecanismo de actuação do fármaco em estudo, a selecção da melhor metodologia deve atender à disponibilidade de equipamentos necessários às diferentes metodologias.

No futuro será necessário efectuar mais ensaios de viabilidade celular que permitam determinar a relação existente entre as diferentes metodologias disponíveis. O conhecimento do perfil de resistência deste parasita permitirá não só implementar terapêuticas adequadas, como também constituir ponto de partida na investigação de novas moléculas que assegurem o sucesso da terapêutica daquela que é considerada a mais frequente parasitose intestinal patogénica (Gardner & Hill, 2001; Savioli et al., 2006; Hausen et al., 2006).

O conhecimento do perfil de resistência deste parasita permitirá não só implementar terapêuticas adequadas, como também poderá constituir o ponto de partida na investigação de novas moléculas que assegurem o sucesso da terapêutica daquela que é considerada a mais frequente parasitose intestinal patogénica (Gardner & Hill, 2001; Savioli et al., 2006; Hausen et al., 2006).

Referências Bibliográficas

- Adam, R. D.** 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.
- Alabaster, O., Magrath, I. T., Habbersett, M.C. & Herman, C.J.** 1979. Effects of cyclophosphamide on the mithramycin – DNA fluorescence of human lymphoma cells: A possible result of guanine alkylation. *The Journal of Histochemistry and cytochemistry.* **27**(1):500-504
- Alabaster, O., Tannenbaum, E., Habbersett, M.C. Magrath, I., & Herman, C.** 1978. Drug-induced changes in DNA fluorescence intensity detected by flow microfluorometry and their implications for analysis of DNA content distributions. *Cancer research.* **38**:1031-1035.
- Arguello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres G.,** 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.
- Bénére, E., da Luz, R. A., Vermeersch, M., Cos, P. & Maes, L.** 2007. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods.* **71**(2):101-6
- Bingham, A., Jarrill, E. & Meyer, E.** 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation *in vitro* and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47**:284-291.
- Boreham, P. F. L., Phillips, R. E. & Shepherd, R. W.** 1985. A comparison of the *in-vitro* activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherap.* **16**: 589-595.
- Borst, P., & Ouellette, M.** 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:427-460.
- Campanati, L. & Monteiro-Leal, L. H.** 2002. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitol Res.* **88**: 80–85.
- Crouch A. A., Seow W. K. & Thong Y. H.** 1986. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **80**: 893-896
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M. & Thong, Y. H.** 1990. Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:246-248.

- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M., Smith, S. E. & Thong, Y. H.** 1991. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:375-379.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Leite, E., Sousa, J. C. F. & Cabral, M.** 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Silva, M. C., Sousa, J. C. F., Manso, O. & Cabral, M.** 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.
- Edwards D. I.** 1993. Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**: 9-20.
- Farbey, M. D., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C.** 1995. *In vitro* drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol.* **25(5)**:593-599.
- Favennec, L., Chochillon, C., Magne, D., Meillet, D., Raichvarg, D., Savel, J. & Gobert, J. G.** 1992. A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cells. *Parasitol Res.* **78(1)**:80-1.
- Finney, D.** 1977. *Probit analysis*. New York, Cambridge. University Press.
- Freeman, C. D., Klutman, N. E. & Lamp, K. C.** 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* **54**:679-409.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R.** 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.
- Gordts, B., Hemelhof, W., Asselman, C. & Butzler, J. P.** 1985. *In vitro* susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **28(3)**:378-380.
- Hamilton, V. T., Habbersett, M. C., Herman, C. J.** 1980. Flow microfluorometric analysis of cellular DNA: Critical comparison of mithramycin and propidium iodide. *J Histochem Cytochem.* 1980 **28(10)**:1125-8.
- Harris, J. C., Plummer, S. & Lloyd, D.** 2001. Anti-giardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **57**:614-619.
- Krishan, A., Ganapathi, R. N. & Israel, M.** 1978. Effect of adriamycin and analogs on the nuclear fluorescence of propidium iodide-stained cells. *Cancer Res.* **38 (11 Pt 1)**:3656-62.

- Jones K. H. & Senft J. A.** 1985. An Improved Method to determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal Of Histochemistry and Cytochemistry*. **(33) 1**: 77-79,
- Majewska, A. C., Kasprzak, W., De-Jonckheere, J. F. & Kaczmarek, E.** 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:67-69.
- Meloni, B., Thompson, R., Reynoldson, J. & Seville, P.** 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.
- Meyer, E. A.** 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp. Parasitol.* **27**:179-183.
- Mineno, T. & Avery, M. A.** 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.
- Morgan, U. M., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. A.** 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.
- Ordoñez, M. G.** 2001. Ensayos Farmacologicos in vitro para evaluar actividad anti-giardiasica. *Rev Cubana Farm;* **35(1)**:66-73.
- Ortega, Y. R. & Adam, R. D.** 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.
- Pearce, D., Reynoldson, J. & Thompson, R.** 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.
- Prudêncio, C., Abrantes, B., Lopes, I. & Tavares, M. A.** 2002. Structural and functional cellular and alterations underlying the toxicity of methamphetamine in rat retina and prefrontal cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **965**: 522-528.
- Rotman, B., Papermaster, B. W.** 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Biochemistry.* **55**: 134:141.
- Sauch, J. F., Flanigan, D., Galvin, M. L., Berman, D. & Jakubowski, W.** 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **57(11)**:3243-7.
- Schupp, D. G. & Erlandsen, S. L.** 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* **53(4)**:704-7.
- Tessier J. L. & Davies G. A. L.** 1999. Giardiasis. Primary Care Update. **6**:1-4.

Townson, S. M., Laqua, H., Upcroft, P., Boreham, P. & Upcroft, J. 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 1998. My favourite cell: *Giardia*. *BioEssays.* **20**:256–263.

Upcroft, J. A. & Upcroft, P. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

Wright, C. W., Melwani, S., Phillipson, J. D. & Warhurst, D. C. 1992. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:517-519.

Capítulo VI
Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Adam, R. D.** 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:447-475.
- Arguello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. & Ortega-Pierres G.,** 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *JAC.* **54**:711-721.
- Bénére, E., da Luz, R. A., Vermeersch, M., Cos, P. & Maes, L.** 2007. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods.* **71(2)**:101-6
- Bingham, A., Jarrill, E. & Meyer, E.** 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation *in vitro* and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **47**:284-291.
- Boreham, P. F. L., Phillips, R. E. & Shepherd, R. W.** 1985. A comparison of the *in-vitro* activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherap.* **16**: 589-595.
- Boreham, P. F. L., Phillips, R. E. & Shepherd, R. W.** 1985. A comparison of the *in-vitro* activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **16**: 589-595.
- Borst, P., & Ouellette, M.** 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:427-460.
- Campanati, L. & Monteiro-Leal, L. H.** 2002. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitol Res.* **88**: 80–85.
- Crouch A. A., Seow W. K. & Thong Y. H.** 1986. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **80**: 893-896
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M. & Thong, Y. H.** 1990. Sensitivity *in vitro* of *Giardia intestinalis* to dyadic combinations of azithromycin, doxycycline, mefloquine, tinidazole and furazolidone. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:246-248.
- Crouch, A. A., Seow, W. K., Whitman, L. M., Smith, S. E. & Thong, Y. H.** 1991. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:375-379.
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Leite, E., Sousa, J. C. F. & Cabral, M.** 2003a. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazol and albendazol. *JAC.* **51**:1017-1020.

- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Silva, M. C., Sousa, J. C. F., Manso, O. & Cabral, M.** 2003b. Comparison between two common methods for measuring *Giardia lamblia* susceptibility to antiparasitic drugs *in vitro*. *Acta Tróp.* **88**:131-135.
- Edwards D. I.** 1993. Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**: 9-20.
- Escobedo, A. A., Alvarez, G., González, M. E., Almirall, P., Cañete, R., Cimerman, S, Ruiz, A & Pérez, R.** 2008. The treatment of giardiasis in children: single-dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. Department of Microbiology, Pediatric Academic Hospital 'Pedro Borrás'. **102(3)**:199-207.
- Favennec, L., Chochillon, C., Magne, D., Meillet, D., Raichvarg, D., Savel, J. & Gobert, J. G.** 1992. A new screening assay for anti-giardial compounds: effects of various drugs on the adherence of *Giardia duodenalis* to Caco2 cells. *Parasitol Res.* **78(1)**:80-1.
- Finney, D.** 1977. *Probit analysis*. New York, Cambridge. University Press.
- Freeman, C. D., Klutman, N. E. & Lamp, K. C.** 1997. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs.* **54**:679-409.
- Gardner, T. B. & Hill, D. R.** 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:114-128.
- Gordts, B., Hemelhof, W., Asselman, C. & Butzler, J. P.** 1985. In vitro susceptibilities of 25 *Giardia lamblia* isolates of human origin to six commonly used antiprotozoal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **28(3)**:378-380.
- Hopkins, R. M., Meloni, B. P., Groth, D. M., Wetherall, J. D., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C.** 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* **83**:44-51.
- Jokipii L. & Jokipii A. M.** 1979. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. *J Infect Dis.* **140(6)**:984-8.
- Jokipii L. & Jokipii A. M.** 1982. Treatment of giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. *Gastroenterology.* **83(2)**:399-404.
- Jones K. H. & Senft J. A.** 1985. An Improved Method to determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal Of Histochemistry and Cytochemistry.* **(33) 1**: 77-79,
- Majewska, A. C., Kasprzak, W., De-Jonckheere, J. F. & Kaczmarek, E.** 1991. Heterogeneity in the sensitivity of stocks and clones of *Giardia* to metronidazole and ornidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:67-69.

- Meloni, B., Thompson, R., Reynoldson, J. & Seville, P.** 1990. Albendazole, a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**:375-379.
- Mineno, T. & Avery, M. A.** 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design.* **9**:841-855.
- Morgan, U. M., Reynoldson, J. A. & Thompson, R. C. A.** 1993. Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:328-331.
- Ortega, Y. R. & Adam, R. D.** 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **25**:545-550.
- Pearce, D., Reynoldson, J. & Thompson, R.** 1996. A comparison of two methods for assessing drug sensitivity in *Giardia duodenalis*. *Appl. Parasitol.* **37**:111-116.
- Prudêncio, C., Abrantes, B., Lopes, I. & Tavares, M. A.** 2002. Structural and functional cellular alterations underlying the toxicity of methamphetamine in rat retina and prefrontal cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **965**: 522-528
- Sauch, J. F., Flanigan, D., Galvin, M. L., Berman, D. & Jakubowski, W.** 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol.* **57**(11):3243-7.
- Schupp, D. G. & Erlandsen, S. L.** 1987. A new method to determine *Giardia* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* **53**(4):704-7.
- Tessier J. L. & Davies G. A. L.** 1999. Giardiasis. Primary Care Update. **6**:1-4.
- Thompson, R. C. A.** 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitology.* **126**:15-35.
- Townson, S. M., Laqua, H., Upcroft, P., Boreham, P. & Upcroft, J.** 1992. Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**:521-522.
- Upcroft, J. A. & Upcroft, P.** 1993. Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol. Today.* **9**:187-190.
- Upcroft, J. A. & Upcroft, P.** 1998. My favourite cell: *Giardia*. *BioEssays.* **20**:256–263.
- Upcroft, J. A. & Upcroft, P.** 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews.* **14**:150-164.

ANEXOS

Anexo I

Meio de cultura TYI-S-33 modificado (Keister, 1983)

<i>Composição:</i>	<i>g/l</i>
Hidrolisado pancreático de caseína	20,0
Extracto de levedura	10,0
Glicose	10,0
Bilis bovina	0,6
Cloreto de sódio	2,0
L-cisteína, cloreto monohidratado	2,0
Ácido ascórbico	0,2
Hidrogenofosfato de potássio	1,0
Dihidrogenofosfato de potássio	0,6
Citrato férrico amoniacal	0,0228

Foram dissolvidos em água destilada os diversos componentes de modo a perfazer um volume final de 900ml, de seguida foram adicionados 100ml de soro bovino inactivado, a 56°C/20min. em banho-de-água. O pH foi acertado para 7,0-7,2 com hidróxido de sódio 1M. Em ambiente asséptico foram adicionados os agentes antimicrobianos de modo a conseguirem-se as concentrações desejadas para cultivo (gentamicina 0,05mg/ml, penicilina G 100unidades/ml, estreptomicina 0,1mg/ml e anfotericina B 0,25µg/ml).

Procedeu-se à ultrafiltração com membrana filtrante de 0,45µm em sistema Nalgene modelo DS0320 e conservou-se o meio a 4°C.

Anexo II

Criopreservação de trofozoítos

Com a finalidade de preservar os isolados resistentes obtidos nas duas metodologias e em ambos os fármacos, foram periodicamente congelados os trofozoítos de *G. lamblia* segundo a metodologia de Hautus *et al.* (1988).

Os tubos de cultura com trofozoítos num período tardio da fase exponencial de crescimento, foram agitados e rejeitado o sobrenadante. Após serem de novo cheios com meio de cultura, foram mergulhados num banho de gelo durante aproximadamente 15 minutos e agitados, periodicamente, afim de que todos os trofozoítos desaderissem das paredes do tubo. Após centrifugação, a 600g/10min./4°C, foi ajustada a concentração das células a, aproximadamente, 2×10^6 /ml com meio de cultura TYI-S-33 modificado e adicionado de DMSO, até concentração final entre 5 e 10%. Procedeu-se depois à distribuição em fracções de 1ml em criotubos (Nunk) e congelação a -80°C, num contentor (Nalgene) com álcool isopropílico.

Para reconstituir as amostras, a descongelação foi realizada rapidamente em banho de água a 37°C, seguido de centrifugação a 600g/10minutos e ressuspensão dos trofozoítos em meio TYI-S-33 modificado. Repetiu-se o processo de centrifugação e ressuspensão, após o que se incubaram a 37°C.