



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Moema de Alencar Hausen

Avaliação do efeito de drogas sobre o processo de diferenciação de *Giardia lamblia* e na interação com células epiteliais intestinais *in vitro*

Rio de Janeiro

2009

Moema de Alencar Hausen

Avaliação do efeito de drogas sobre o processo de diferenciação de *Giardia lamblia* e na interação com células epiteliais intestinais *in vitro*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Helene Santos Barbosa

Coorientadora: Prof.^a Dra. Laís de Carvalho

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

H 249 Hausen, Moema de Alencar

Avaliação do efeito de drogas sobre o processo de diferenciação de *Giardia lamblia* e na interação com células epiteliais intestinais in vitro / Moema de Alencar Hausen. – 2009.
67 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Helene Santos Barbosa
Coorientadora: Prof.^a Dra. Laís de Carvalho

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Parasitologia – Teses. 2. *Giardia lamblia* – Teses. 3. Células epiteliais – Teses. 4. Antiparasitários - Teses. 5. Giardíase – Tratamento – Efeito de drogas – Teses. 6. Interações hospedeiro-parasita. I. Barbosa, Helene Santos. II. Carvalho, Laís de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira – CRB7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Moema de Alencar Hausen

Avaliação do efeito de drogas sobre o processo de diferenciação de *Giardia lamblia* e na interação com células epiteliais intestinais *in vitro*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de setembro de 2009.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Laís de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Helene Santos Barbosa (Orientador)

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Erick Vaz Guimarães

Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. José Roberto Machado Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Instituto Nacional do Câncer

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e à minha família.

Agradeço e dedico este trabalho ao professor Luiz Henrique Monteiro Leal (em memória) que me orientou na maior parte de minha trajetória acadêmica, cujo empenho e dedicação ainda estão muito presentes neste trabalho. Muito obrigada de coração meu querido orientador, fique em paz!

Sinto-me imensamente grata às Profs. Dras. Helene Barbosa e Laís de Carvalho por terem me “adotado” como aluna e terem me fornecido todos os subsídios para continuar.

Agradeço a Dalva Lira por todo apoio técnico, intelectual e acima de tudo pela amizade sincera e fiel.

Agradeço a Richard Oliveira e a Prof. Dra. Ana Carolina Stumbo, por todo apoio na cultura de células.

Agradeço aos Profs. Drs. Jorge José de Carvalho, Neide Lemos Azevedo, Marcos Farina de Souza, Luiz Cristóvão M. Sobrino Porto e Carlos Alberto Mandarin de Lacerda por todo apoio científico e incentivo.

Agradeço ao pesquisador Dr. José Morgado Diaz e ao amigo Júlio Cesar Madureira de Freitas-Jr .

Agradeço a UERJ e seus funcionários os quais convivi, durante os nove anos de trajetória acadêmica desde a graduação.

Quanto mais eu aprendo mais eu sei que ainda falta muito para eu aprender pouco.

A autora

RESUMO

HAUSEN, Moema de Alencar. *Avaliação do efeito de drogas sobre o processo de diferenciação de Giardia lamblia e na interação com células epiteliais intestinais in vitro*. 2009. 67 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Os protozoários do gênero *Giardia* apresentam como característica principal, a capacidade de diferenciação em duas formas, o cisto inerte e infectante, e o trofozoíto móvel e vegetativo, cuja adesão ao epitélio intestinal caracteriza o parasitismo. Seu ciclo de vida compreende o encistamento, transformação do trofozoíto em cisto, enquanto o desencistamento se caracteriza pelo inverso. A giardíase, é uma das principais enfermidades parasitárias que acometem crianças de regiões com saneamento básico precário no Brasil. O tratamento atual em humanos envolve principalmente os fármacos da família dos benzimidazóis. Outros fármacos como o pamoato de pirantel (PP) e o metronidazol (MZ) são mais utilizados em tratamentos veterinários, sendo este último pouco utilizado por acarretar efeitos colaterais, i.e., inflamação da mucosa intestinal. Não há na literatura, dados que avaliem quão infectante são os cistos de *Giardia* eliminados durante o tratamento, ou mesmo, um estudo que avalie possíveis atividades sinérgicas das principais drogas anti-parasitárias no tratamento contra giardia. Deste modo, este estudo avaliou estes dois questionamentos em modelo in vitro com os principais fármacos utilizados no tratamento clínico humano e veterinário. No primeiro trabalho, foram analisados os efeitos de benzimidazóis sobre a diferenciação de *Giardia* e sua viabilidade pós-tratamento. No segundo trabalho, sobre a forma trofozoíta foram testados o MZ e PP combinados ou não, a fim de verificar atuação sinérgica contra o parasita, mas sem afetar a viabilidade das células intestinais em co-cultura. Os resultados demonstraram que embora o albendazol (AB) não tenha inibido completamente o encistamento, mesmo em doses baixas houve 100% de inibição do desencistamento. Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a ultraestrutura do disco ventral bem como os flagelos despolimerizaram em corpos amorfos na forma cística. Este provavelmente foi o principal fator para inviabilizar a reorganização do disco ventral e estruturas associadas durante o desencistamento. A incapacidade em desencistar descrita aqui, tornou o AB como a principal droga candidata para que o tratamento seja tão eficaz quanto livre de contaminações ambientais pelos cistos eliminados. No segundo trabalho, de acordo com os isobogramas gerados a partir da contagem de trofozoítos sob os efeitos das drogas, revelaram que houve efeito sinérgico entre o MZ e PP, ou seja, a menor concentração de MZ potencializou o efeito de PP, induzindo a inviabilidade dos trofozoítos sem afetar as células hospedeiras em co-cultura. Os resultados apresentados apontam que além do excelente prognóstico ao tratamento de giardia, as drogas testadas in vitro possuem potencial tanto para tratar a giardíase, quanto para inibir a sua disseminação pelo hospedeiro durante o tratamento. Adicionalmente, sobre os trofozoítos, o MZ quando combinado ao PP tem potencial para um tratamento eficaz com menos efeitos adversos sobre as células intestinais.

Palavras-chave: Giardíase. *Giardia lamblia*. Drogas anti-parasitárias. Interação parasito-célula hospedeira. IEC-6. Diferenciação celular in vitro.

ABSTRACT

HAUSEN, Moema de Alencar. *Drug effects evaluation under the differentiation process of Giardia lamblia and during in vitro interaction with gut epithelial cells*. 2009. 67 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

The protozoan of the genus *Giardia* are considered the most primitive eukaryotic cells in evolutive scale. The main characteristics are the ability to differentiate in two forms, the infective and inert cyst, and the motil and vegetative trophozoite in which its adhesion to gut epithelium characterizes the parasitism. Its life cycle comprises the encystation, that is the transformation of the trophozoite in cyst, whereas the excystation is characterized by the inverse. Giardiasis is one of the main parasitic diseases that affect children from regions with precarious basic sanitation in Brazil. Current treatment in humans mainly involves the benzimidazole family drugs. Other drugs such as pyrantel pamoate (PP) and metronidazole (MZ) are more commonly used in veterinary treatments, the latter one being rarely used because it causes side effects, i.e. inflammation of the intestinal mucosa. Most drugs act on giardia trophozoites and bind primarily to the microtubule structures of the giardia cytoskeleton. Regarding treatment, the main questions about the effectiveness are based on healing, and secondarily, on the removal of cysts. There are in the literature, no data evaluating how infective *Giardia* cysts are when eliminated during treatment, or even a study to evaluate possible synergistic activities of the major anti-parasitic drugs for the treatment against *Giardia*. Thus, this study evaluated these two questions in an *in vitro* model with the main drugs used in human and veterinary clinical treatment. In the first study, we analyzed the effects on the differentiation benzimidazoles *Giardia* and their viability after treatment. In the second work, on the trophozoite form the MZ and PP were combined or not, in order to verify synergistic action against the parasite but having focus to not reduce the viability of the intestinal cells in co-culture. The results demonstrated that although albendazole (AB) did not completely inhibit encystation, even at low doses there was 100% inhibition of excystation. Transmission electron microscopy results revealed that the ultrastructure of the ventral disc as well as the flagella depolymerized in amorphous bodies in the cystic form. This was probably the main factor that prevented the reorganization of the ventral disc and associated structures during the excystation. The inability to excyst described herein has made AB as the main candidate drug in order to be effective in both treatment and environment, taking it free of contamination. In the second study, according to the isobolograms generated from the trophozoites count under the effects of drugs, it revealed that there was a synergistic effect between the MZ and PP, i.e., the lowest concentration of MZ potentiated the effect of PP, leading to inviability of the trophozoites with no effects in host cells under the co-culture. The results indicated that in addition to the excellent prognosis for the treatment of giardia, the drugs tested *in vitro* have the potential both to treat giardiasis and to inhibit their spread by host during treatment. In addition, on trophozoites, MZ when combined with the PP has the desired properties for an effective treatment with fewer adverse effects on intestinal cells.

Keywords: Giardiasis. *Giardia lamblia*. Anti-parasitic drugs. Parasite-host cells interaction. IEC-6. In vitro Cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema mostrando o ciclo monoxênico de <i>Giardia</i>	11
Figura 2	Microscopia Eletrônica de <i>G. lamblia</i> e representação esquemática da forma trofozoíta	13
Figura 3	Microscopia eletrônica de transmissão de cisto de <i>G. lamblia</i>	16
Figura 4	Esquema do ciclo de <i>G. lamblia</i> indicando a ploidia nuclear	19

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	9
1	PARASITO <i>GIARDIA SP.</i>	10
1.1	Forma trofozoíta	12
1.2	Forma cística e encistamento	15
1.3	Desencistamento	18
2	MECANISMO BIOQUÍMICO DA AÇÃO DE DROGAS ANTI- <i>GIÁRDIA</i>.....	20
2.1	Metronidazol (MZ).....	20
2.2	Pamoato de Pirantel (PM).....	21
2.3	Albendazol.....	22
2.4	Tiabendazol (TB).....	23
2.5	Mebendazol (MB).....	23
2.6	Benzimidazol (BZ).....	24
3	JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	26
4	OBJETIVO.....	27
4.1	Objetivos específicos.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1	Cultura de células.....	28
5.2	Encistamento.....	28
5.3	Ensaio com drogas.....	29
5.4	Avaliação da inibição do encistamento.....	29
5.5	Avaliação da eficácia do desencistamento.....	30
5.6	Co-cultura de Giardia e IEC-6.....	30
5.7	Determinação de IC50 e FICI.....	31
5.8	Avaliação da viabilidade de IEC-6 em combinação com as drogas.....	32
6	RESULTADOS.....	33
6.1	Giardia lamblia: a report of drug effects under all differentiation (Artigo publicado).....	33
6.2	Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on Giardia lamblia (Artigo publicado).....	41
7	DISCUSSÃO	53

7.1	Discussão referente ao primeiro artigo publicado.....	53
7.2	Discussão referente ao segundo artigo publicado.....	56
	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Giardia* são considerados os eucariontes mais primitivos dentro da escala zoológica, pertencentes ao Filo *Sarcomastigophora*, à classe *Zoomastigophorea*, à ordem *Diplomonadida* e à família *Hexamitidae*. Estes flagelados foram primeiramente descritos por Antoine van Leeuwenhoek em 1681. A denominação de *Giardia* deveu-se a Kunstler que em 1882 descreveu um microorganismo detectado em girinos, dos quais originou o nome do gênero.

Mais de quarenta espécies de giárdia foram descritas ao longo do tempo, em função do hospedeiro em que se encontravam. Com o avanço das técnicas de microscopia essas espécies foram agrupadas com base na descrição morfológica minuciosa do corpo celular da *Giardia* propondo a existência de três espécies diferenciadas: *G. agilis* (parasito de anfíbios), *G. muris* (de roedores, aves e répteis) e *G. lamblia* (sinônimo *G. duodenalis* e *G. intestinalis*), parasito de mamíferos, incluindo o homem. Durante a década de 1990, muitos pesquisadores adotaram o nome *Giardia intestinalis*, mas, atualmente, a denominação de *Giardia lamblia* continua sendo muito aceita pela comunidade científica (Adam, 2001).

1. PARASITO *GIARDIA SP.*

Os protozoários do gênero *Giardia* são considerados os eucariontes mais primitivos dentro da escala zoológica, pertencentes ao Filo *Sarcomastigophora*, à classe *Zoomastigophorea*, à ordem *Diplomonadida* e à família *Hexamitidae*. Estes flagelados foram primeiramente descritos por Antoine van Leeuwenhoek em 1681. A denominação de *Giardia* deveu-se a Kunstler que em 1882 descreveu um microorganismo detectado em girinos, dos quais originou o nome do gênero.

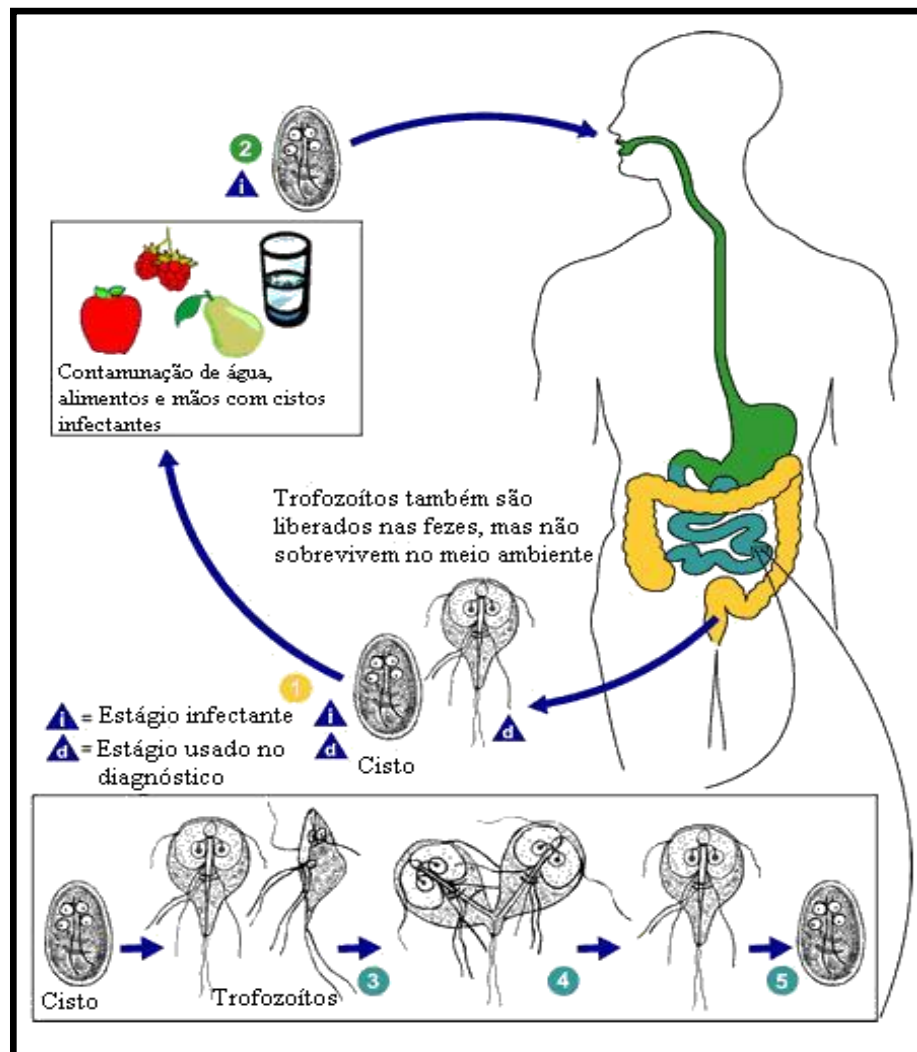
Mais de quarenta espécies de giárdia foram descritas ao longo do tempo, em função do hospedeiro em que se encontravam. Com o avanço das técnicas de microscopia essas espécies foram agrupadas com base na descrição morfológica minuciosa do corpo celular da *Giardia* propondo a existência de três espécies diferenciadas: *G. agilis* (parasito de anfíbios), *G. muris* (de roedores, aves e répteis) e *G. lamblia* (sinônimo *G. duodenalis* e *G. intestinalis*), parasito de mamíferos, incluindo o homem. Durante a década de 1990, muitos pesquisadores adotaram o nome *Giardia intestinalis*, mas, atualmente, a denominação de *Giardia lamblia* continua sendo muito aceita pela comunidade científica (Adam, 2001).

A *Giardia lamblia* é um protozoário flagelado, binucleado que está presente no trato intestinal dos humanos e de vários animais mamíferos de abrangência mundial, com maior prevalência em jovens e em áreas endêmicas onde as condições sanitárias são precárias (Mohammed *et al*, 2008). O ciclo biológico da *Giardia* apresenta duas formas evolutivas: o cisto e o trofozoíto. Os cistos, formas infectantes do parasito, são relativamente inertes e resistentes às condições adversas do meio (Friend, 1966; Holberton, 1973; Owen *et al*, 1979; Adam, 1991). Estas características permitem que estes organismos sobrevivam no meio ambiente por períodos prolongados de tempo, sendo, por isso, muito importantes para a manutenção de seu ciclo de vida (Ward *et al*, 1985).

O modo de transmissão de *Giardia* se dá através de água e de alimentos contaminados por fezes de indivíduos infectados com cistos (Figura 1). Após sua ingestão, ocorre a etapa de desencistamento, no duodeno, como resultado da exposição dos parasitos ao pH do ácido gástrico e às enzimas pancreáticas, quimiotripsina e tripsina, produzindo dois trofozoítos para cada cisto (Feely *et al*, 1991; Hill, 1993). Já os trofozoítos replicam-se nas criptas do duodeno e na parte superior do jejuno, onde se reproduzem assexuadamente por fissão binária. O destino final do parasito, nesta forma flagelada, é a região do duodeno, aonde irá se fixar às células epiteliais deste órgão. Os trofozoítos, encistam-se no íleo, possivelmente em

consequência do contato com os sais biliares ou da falta de colesterol (Gillin *et al*, 1988; Lujan *et al*, 1996). A concentração de cloro usada na água potável não é suficiente para eliminar os cistos de *Giardia*. Eles podem permanecer viáveis por vários meses e apenas a filtração é considerada eficaz para a sua eliminação (Ortega & Adam, 1997).

Figura 1. Esquema mostrando o ciclo monoxênico de *Giardia*.



Nota: Um cisto ao desencistar gera dois trofozoítos móveis que aderem ao epitélio intestinal e se dividem por fissão binária. Cada trofozoíto ao encistar gera um cisto inerte revestido por uma parede cística.

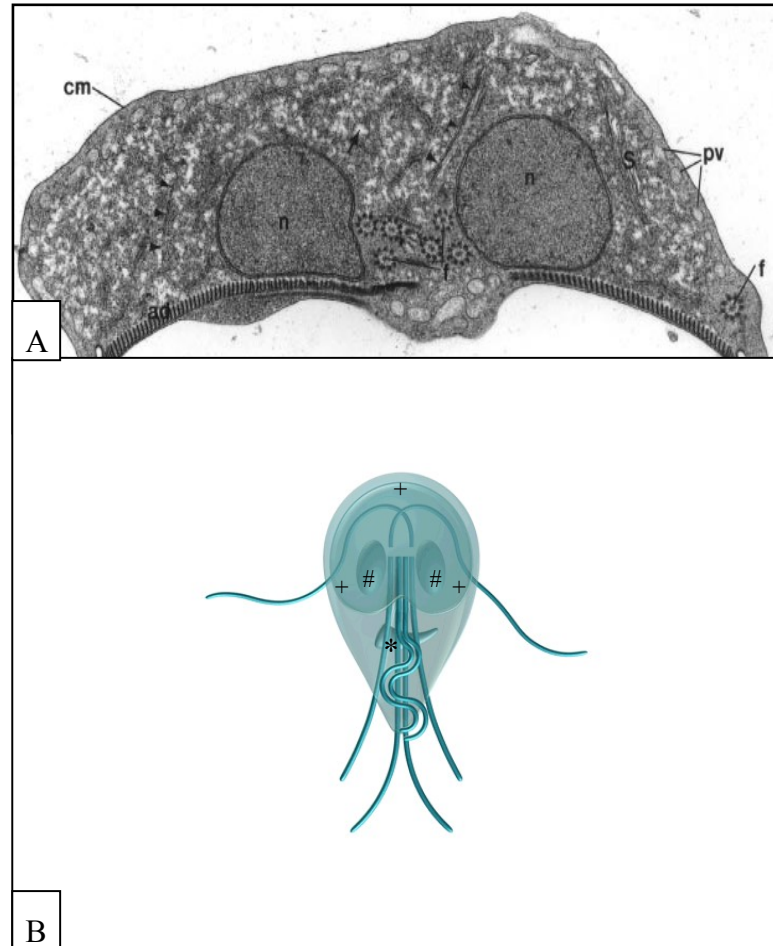
Fonte: Esquema adaptado da homepage do Centro de Controle e Prevenção de doenças americano (CDC online). (Centers for Disease Control and Prevention [homepage na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01[atualizada em 2002 May 16; acesso em 2002 Jul 9].Disponível em: <http://www.cancer-pain.org/.retirado de Parasitology Diagnostic www.dpd.cdc.gov>).

1.1. Forma trofozoíta

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* têm de 12 a 15 μm de comprimento por 6 a 8 μm de largura (Kirkpatrick & Farrell, 1982; Campanati *et al*, 2001), com formato de pera, apresentando simetria bilateral, oito flagelos e achatamento dorso ventral. Na superfície ventral possui um disco que ocupa dois terços da face e recebe o nome de disco ventral ou disco adesivo. Esta estrutura tem forma achatada, dotada de uma rede de microtúbulos e microfibras dispostos de maneira espiralizada e mede de 8 a 10 μm de diâmetro. Esse disco adesivo é uma das estruturas responsáveis pela fixação do protozoário; o batimento flagelar ventral e a flange também possuem papel na adesão do parasito a um substrato. O protozoário se reproduz assexuadamente, por divisão binária longitudinal (Adam, 2001).

Como protozoários flagelados do gênero *Giardia*, os trofozoítos apresentam flagelos aos pares, emergindo nas posições: anterior, latero-posterior, caudal e ventral (Fig. II). Os trofozoítos são formados por axonemas, seguindo o mesmo arranjo dos flagelos dos demais eucarióticos, que partem de corpos basais posicionados nos pólos anteriores dos núcleos (Adam, 2001). A Figura II é um esquema da ultraestrutura da *Giardia* que possibilitará o entendimento da descrição de sua estrutura e organelas.

Figura 2. Microscopia Eletrônica de *G. lamblia* e representação esquemática da forma trofozoíta



Legenda: **(A)** Ultraestrutura observada por MET de um corte transversal de um trofozoíta de *G. lamblia* e suas principais organelas. (cm) plasmalema; (pv) vesículas periféricas; (f) flagelo; (ad) disco adesivo; (n) núcleo; (setas) numerosas endomembranas dispersas no citoplasma; (cabeças-de-seta) grânulos de glicogênio. **(B)** Representação esquemática demonstrando o trofozoíta visto longitudinalmente. (*) corpo mediano; (#) núcleos; (+) disco adesivo.

Fonte: (A): retirado de Gillin et al, 1996; (B): desenhado por Luiz Henrique Carvalho).

Estudos prévios sugerem que os flagelos auxiliem tanto na locomoção quanto na manutenção da adesão dos trofozoítos às células intestinais do hospedeiro, possivelmente promovendo sucção pela depressão causada pelo disco adesivo (Holberton, 1973; Monteiro-Leal *et al*, 1996).

O corpo mediano da *Giardia* é uma estrutura exclusiva desse gênero e tem sido usado como ferramenta taxonômica. Ele difere discretamente na forma e posição em cada uma das

três espécies, como foi definido por Filice em 1952. Em *G. lamblia* o corpo mediano é descrito como em forma de clava e situa-se transversalmente ao eixo maior da célula, no meio do corpo celular. Os primeiros estudos feitos descreviam-no como corpos parabasais. Entretanto, estudos realizados por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o corpo mediano é composto, em sua grande parte, por microtúbulos (Friend, 1966; Holberton, 1973; Brugerolle, 1975). Em *G. lamblia* é encontrado um, às vezes, dois corpos medianos. Existem outros componentes no corpo mediano, além dos microtúbulos, Brugerolle (1975) demonstrou a presença de pequenos apêndices nos microtúbulos do corpo mediano similares às microfítas do disco ventral. Em *Giardia muris* o corpo mediano é oval com microtúbulos curvados e alguns se estendem ventralmente em direção à porção caudal do flagelo. Nenhuma função específica até o momento foi descrita para o corpo mediano, no entanto, especula-se que sirva de reserva de proteínas do citoesqueleto, para rápida mobilização, sendo, então, utilizadas na mitose e encistamento (Brugerolle, 1975; Feely *et al*, 1991).

A análise por MET revelou que o citoplasma de *Giardia spp.* apresenta logo abaixo da membrana plasmática uma série de vacúolos denominados vesículas periféricas (Friend, 1966; Owen, 1980). Estas estruturas podem ser observadas inclusive na área nua do disco adesivo, que é desprovida de elementos do citoesqueleto (Friend, 1966; Holberton, 1973; Owen, 1980). A maioria das vesículas encontradas na periferia é oval e/ou alongada, podendo ter comprimento variando entre 100 e 400 nm, e seu lúmen apresenta material de baixa eletrondensidade (Friend, 1966; Owen, 1980; Feely & Dyer, 1987). Algumas vesículas podem ser observadas com material granular em seu interior (Friend, 1966). Essas vesículas, aparentemente, são derivadas de processos endocíticos do trofozoíto (Bockman & Winborn, 1968; Kattenbach *et al*, 1991), apresentam fosfatase ácida (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988) e acumulam macromoléculas ingeridas pelo protozoário (Kattenbach *et al*, 1991). Estudos mostraram que essas vesículas podem representar um sistema de organelas integradas (Lanfrendi-Rangel *et al*, 1998).

Os dois núcleos esféricos de *Giardia* estão medianamente localizados na porção alargada da célula (Fig. II), apresentam aproximadamente 1 µm de diâmetro e juntos ocupam aproximadamente um quarto do comprimento e dois terços da largura da célula (Friend, 1966). Aparentemente, os dois núcleos de *Giardia* são idênticos tanto morfológicamente, quanto na quantidade de DNA, sendo, provavelmente, ambos haplóides (Kabnick & Peattie, 1990) e quando o envoltório nuclear apresenta ribossomos em sua face citoplasmática. Quando ocorre a divisão binária os núcleos se dividem ao mesmo tempo. No entanto, não está estabelecida a importância dos dois núcleos, e questiona-se a troca de material cromossomal

entre eles (Adam, 1991). Outras estruturas presentes no citoplasma desse flagelado são: retículo endoplasmático rugoso, grânulos de glicogênio e ribossomos.

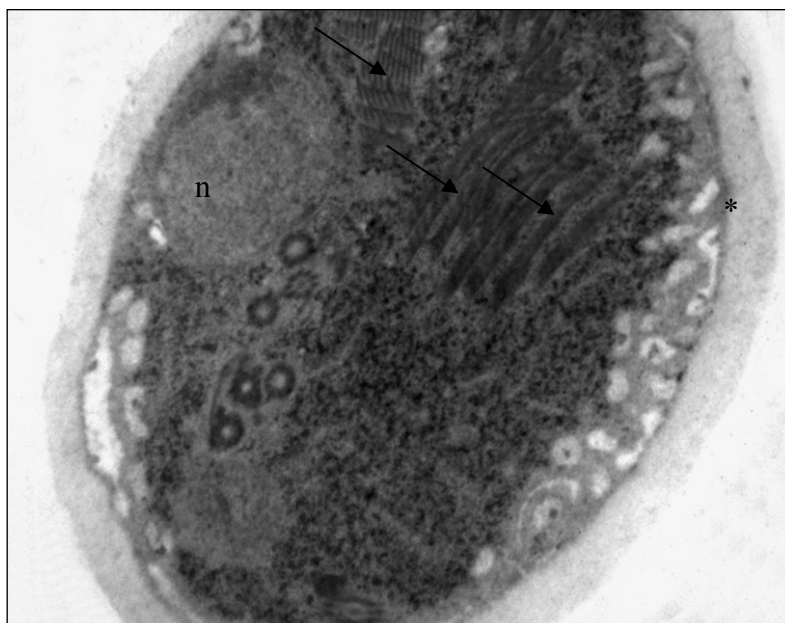
A *Giardia*, como outros protozoários da família Hexamitidae, carece de algumas organelas encontradas em eucariotos superiores, como mitocôndrias e peroxissomos. Por muito tempo acreditou-se que o parasito não possuía complexo de Golgi, entretanto com o avanço das técnicas *in vitro* que promovem o encistamento, tornou-se possível a detecção de uma estrutura semelhante a essa organela (Reiner *et al*, 1990). O aparecimento dessa estrutura foi justificado pela intensa atividade sintética durante a fase de formação da parede cística. Luján e colaboradores (1995a) detectaram, através de frações subcelulares de trofozoítos na fase de encistamento, enzimas que se localizam no complexo de Golgi. Lanfredi-Rangel e colaboradores (1999) demonstraram a presença de uma organela semelhante ao complexo de Golgi na região perinuclear, através da marcação pela molécula ceramida C6-NBD (marcador conhecido de Golgi em células de mamíferos). A presença desta organela não foi detectada na fase vegetativa do parasito (Gillin *et al*, 1996). Em razão desses dados, supõe-se que o seu aparecimento na fase de encistamento esteja relacionado com a formação da parede cística.

1.2 Forma cística e encistamento

A diferenciação dos cistos é importante para a sobrevivência da espécie no meio externo, permitindo a resistência a ambientes secos e a mecanismos de desinfecção. A parede do cisto, que não está presente na forma trofozoítica, confere ao cisto sua resistência característica (Bingham & Meyer, 1979). A parede cística também permite ao parasito ultrapassar a barreira ácida estomacal, durante o início da infecção no hospedeiro (Reiner *et al*, 1993). O processo de encistamento se inicia no íleo, e o portador da giardíase elimina cistos com as fezes.

Os cistos possuem uma forma oval, com dimensões que variam entre 8 e 12 µm em seu comprimento e 7 a 10 µm de largura. No revestimento externo apresenta uma espessa parede de aproximadamente 0,3-0,5 µm, birrefringente ao contraste interferencial (Sheffield & Bjorvatn, 1977). A Figura III mostra detalhes da apresentação das organelas na forma cística.

Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de cisto de *G. lamblia*



Legenda: Eletromicrografia de transmissão de um cisto maduro de *G. lamblia* evidenciando a espessa parede cística (*), núcleos (n), axonemas (cabeças-de-seta), disco adesivo fragmentado (setas) e vesículas periféricas (v).

Fonte: Retirado de Hausen e colaboradores, 2006.

Por microscopia eletrônica de transmissão observa-se que a parede cística é composta por duas camadas bem distintas: a primeira, mais interna consiste de estruturas fibrilares que, em estudos por MEV, mostram filamentos de 7 a 20 nm de diâmetro. Estes filamentos estão firmemente agrupados com interconexões formadas por filamentos finos e curtos, e apresentam-se intercalados com pequenos grânulos (Erlandsen *et al*, 1989). A segunda camada, mais externa e adjacente à primeira, é formada por uma densa porção membranosa (Fig. III).

Estudos bioquímicos de encistamentos realizados *in vitro* mostraram que a parede cística é composta basicamente por dois açúcares, galactosamina e N-acetil-galactosamina, os quais são produzidos a partir da ativação de dois genes CWP1 e CWP2, respectivamente (Luján *et al*, 1995b). Acredita-se que a ativação destes genes esteja relacionada principalmente com o pH alcalino. Abaixo da camada interna da parede cística é observado um extenso sistema lacunar que aparece em toda a periferia da célula. Esse sistema lacunar é determinado por uma fina camada citoplasmática que o separa da membrana celular e é constituído por material de baixa eletrodensidade. Numerosos vacúolos na periferia do cisto

possuem no seu interior material de aspecto similar ao observado no sistema lacunar, porém, nenhuma correlação entre si foi descrita até o momento (Sheffield & Bjorvatn, 1977).

De acordo com a maturação do cisto podemos encontrar de dois a quatro núcleos com dimensões menores do que as encontradas nos trofozoítos, que apresentam nucleoplasma denso e envoltório nuclear típico (Sheffield & Bjorvatn, 1977). Entre os núcleos podem ser visualizados corpúsculos basais e, normalmente, encontram-se três pares de axonemas próximos ao envoltório nuclear. O quarto par é, quase sempre, encontrado na região do sistema lacunar. Além dos microtúbulos encontrados associados aos axonemas, outros podem ser observados com disposição aleatória (Sheffield & Bjorvatn, 1977).

O disco adesivo, por sua vez, se apresenta fragmentado e pode ser visualizado no citoplasma do cisto, em dois pares em pólo oposto à região nuclear (Palm *et al*, 2005). Os fragmentos são compostos por microtúbulos paralelos e microfita. Inúmeros ribossomos estão presentes no citoplasma. Grânulos de glicogênio foram identificados dispersos no citoplasma, reforçando a idéia de que os cistos são metabolicamente ativos.

No que diz respeito à obtenção de cistos duas técnicas têm sido rotineiramente utilizadas, uma obtida a partir de fezes e a outra a partir do encistamento *in vitro*, mais detalhes estão descritos a seguir: (a) Para a obtenção de grandes quantidades de cistos nas fezes utiliza-se uma técnica de purificação, através de gradientes de sacarose de diversas densidades (Roberts-Thomson *et al*, 1976). O emprego desta técnica evita a presença da flora bacteriana normal e “debris” fecais, facilitando o desenvolvimento das pesquisas neste campo (Schupp *et al*, 1988); (b) A partir do cultivo de trofozoítos *in vitro* foram desenvolvidas técnicas de encistamento, facilitando a compreensão do mecanismo utilizado pelo trofozoíto para promover o encistamento (Gillin *et al*, 1987; Schupp *et al*, 1988; Faubert *et al*, 1991; Kane *et al*, 1991). Estudos com clones diferentes da cepa WB indicam que variações ambientais ténues podem ser necessárias para que o processo de encistamento *in vitro* ocorra, como a substituição do soro bovino por uma solução de lipoproteína-colesterol (Reiner *et al*, 1995). No hospedeiro, o processo de encistamento ocorre de forma contínua (Reiner *et al*, 1990).

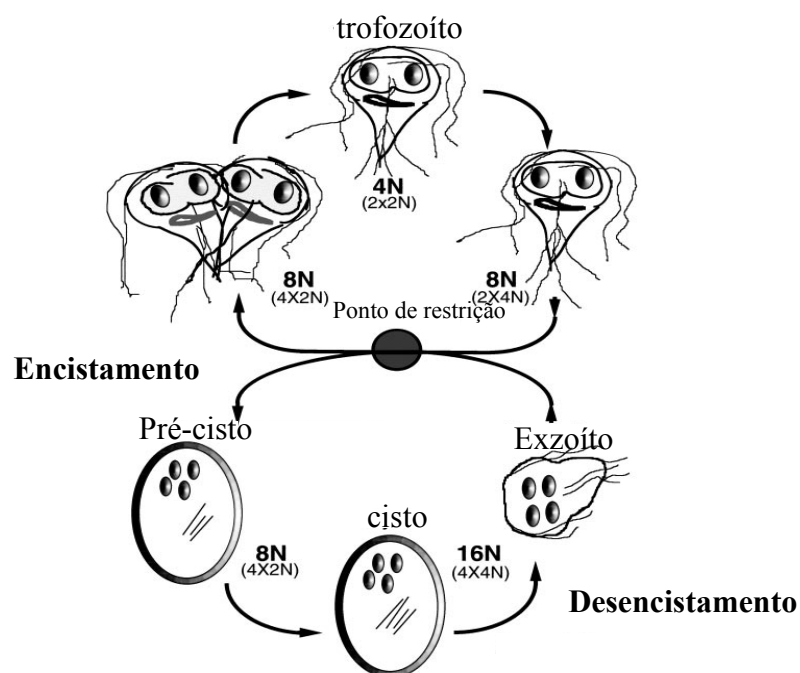
1.3 Desencistamento

O desencistamento é uma fase do ciclo de vida do parasito relativamente curta, ocorre cerca de duas horas após a ingestão do cisto pelo hospedeiro. Este processo de diferenciação se caracteriza pela liberação de um exzoíto pelo cisto, que é a forma intermediária sem morfologia típica e considerada um “pré-trofozoíto”, que rapidamente sofre citocinese gerando dois trofozoítos 8N que em uma nova citocinese gera mais dois trofozoítos 4N, totalizando quatro trofozoítos formados a partir de um único cisto. O desencistamento *in vitro* apresenta três estágios bem definidos. No primeiro estágio, em meio ácido, a membrana plasmática se destaca da parede cística. No segundo estágio, a célula reorganiza seu citoesqueleto e no terceiro, emerge o exzoíto. Abel e colaboradores (2001) relataram que a proteína quinase-A está envolvida no início do desencistamento enquanto que, em estágio mais avançado, para emergir do compartimento cístico, ocorre sinalização mediada por cálcio (Reiner *et al*, 2003). Em todos os eucariotos um anel contrátil de actina-miosina é o mecanismo fundamental da citocinese. Nas leveduras o aparato mitótico terminal é responsável por regular a atividade do anel contrátil e genes semelhantes à actina, cinesina e a algumas proteínas envolvidas no aparato mitótico terminal já foram descritas (Tem1p, Rac e Cyclin B/Cdk 1) em *Giardia* (Smith *et al*, 1998), sugerindo que a maquinaria básica que regula este processo é semelhante ao que ocorre em leveduras. Durante a forma vegetativa os trofozoítos apresentam ciclos celulares de ploidias que variam de 4N ou 8N. Quando o estímulo para o encistamento é disparado, a giárdia inicia sua diferenciação ao chegar na fase G2 ou M. A fase final do encistamento é caracterizada pela divisão nuclear e o DNA é replicado gerando cistos com uma ploidia de 16N. Quando ocorre o desencistamento, o exzoíto quadrinucleado recém liberado apresenta ploidia de 16N. O exzoíto se divide duas vezes sem replicação do DNA e a partir de um exzoíto são formados quatro trofozoítos (Figura IV) (Bernander *et al*, 2001; Svard *et al*, 2003).

As modificações na forma da célula durante a diferenciação para trofozoíto foram descritas por Hetsko e colaboradores (1998), que caracterizou três estágios de acordo com o meio utilizado. Os primeiros sinais indicativos de que o cisto disparou seu processo de desencistamento se apresentam, ultraestruturalmente, pelo surgimento de um a dois pares de protusões de citoplasma sem ribossomos ou glicogênio no interior do espaço peritrófico, caracterizando o estágio I onde ocorre exposição dos cistos a um pH ácido. Fosfatase ácida é liberada no espaço peritrófico enquanto a flange surge neste espaço e pode estar relacionada

com o estabelecimento da polaridade celular nesta fase. No segundo e terceiro estágios do encistamento o espaço peritrófico é aumentado e o parasito se apresenta praticamente separado da parede cística que, por sua vez, apresenta-se menos densa. Finalmente, a parede se rompe e em poucos minutos emerge o exzoíto. Cerca de 60 minutos após o desencistamento, os trofozoítos e seus núcleos são observados em vários estágios de divisão, incluindo células filhas conectadas, tanto ventral quanto lateralmente.

Figura 4. Esquema do ciclo de *G. lamblia* indicando a ploidia nuclear

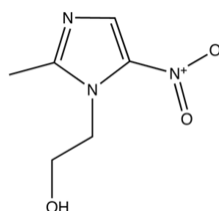


Legenda: Diversas modificações na ploidia nuclear são evidentes em cada fase do ciclo de *G. lamblia*, tanto no encistamento quanto no desencistamento. O ponto de restrição irá disparar (mediante estímulo) a mudança de fase do ciclo.

Fonte: Modificado de Bernander e colaboradores, 2001.

2. MECANISMO BIOQUÍMICO DA AÇÃO DE DROGAS ANTI-*GIÁRDIA*

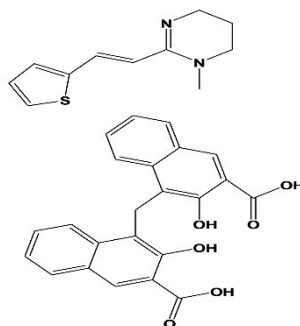
Vários compostos químicos foram desenvolvidos nos últimos anos para o tratamento da giardíase. Muitos deles são utilizados no tratamento de doenças helmínticas ou bacterianas. As drogas comumente empregadas incluem os fármacos da classe dos nitroimidazóis (metronidazol), dos nitrofuranos (furazolidona), dos benzimidazóis (albendazol, mebendazol, tiabendazol e mebendazol) e das tetra-hidropirimidinas (pamoato de pirantel). Maiores detalhes das drogas escolhidas neste trabalho estão expostos a seguir. (As fórmulas moleculares estão representadas ao lado de cada droga descrita).



2.1. Metronidazol (MZ)

Embora o emprego do MZ contra parasitoses não seja recomendado pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration), é ainda um dos tratamentos mais comuns na América Latina contra *Giardia*, além de ser amplamente utilizado na medicina veterinária sendo o principal princípio ativo do medicamento comercialmente denominado *Giardicid*® (CEPAV PHARMA LTDA). Esse nitroimidazol é considerado pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) citotóxico e carcinogênico. Em pacientes com câncer, o MZ radiosensibilizado é adicionado em altas concentrações em tumores com características hipóxicas (Lamp *et al*, 1999). Fortes efeitos colaterais estão diretamente relacionados à administração de MZ sendo os principais: distúrbios gastrointestinais, gosto metálico na boca e cefaléia. Dentre todos os nitroimidazóis, o metronidazol é a droga cujo mecanismo de ação em *Giardia* tem sido mais estudado (Smith *et al*, 1988; Sousa & Poiars-da-Silva 1999; Campanati & Monteiro-Leal, 2002). Este fármaco utiliza o metabolismo anaeróbico da célula. Uma vez ingerido pelo parasito, a piruvato ferredoxina oxireductase (PFOR), uma proteína transportadora presente em *Giardia*, doa elétrons para o grupo nitro deste composto (Muller, 1983; Smith *et al*, 1988). O MZ reduzido serve como um aceptor de elétrons o qual se liga ao DNA, ocasionando danos como a quebra e “cross-link” das fitas, levando à morte do parasito

(Upcroft & Upcroft, 1998; Gardner & Hill, 2001). Ensaios morfológicos, realizados em estudos anteriores, demonstraram que essa droga tem efeito na ultraestrutura do parasito (Campanati & Monteiro-Leal, 2002). Após a incubação das células com esse composto foram observadas estruturas membranosas no interior das células e mudanças no tamanho das vesículas periféricas (Campanati & Monteiro-Leal, 2002). No entanto, nenhuma mudança no citoesqueleto de trofozoítos tratados pode ser detectada. O estudo mais recente mostrou que, o MZ inibiu significativamente a diferenciação em cistos viáveis na cultura *in vitro*, na presença de MZ durante o processo de encistamento (Hausen *et al*, 2006).



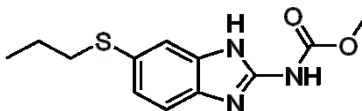
2.2. Pamoato de Pirantel (PM)

Os primeiros testes utilizando pamoato de pirantel, na década de 70, logo demonstraram sua eficiência contra helmintos, posteriormente ao ser combinado com outras drogas como mebendazol, praziquantel ou ivermectina, gerou altas taxas de curas em animais ou em crianças infectadas com nematódeos (Shield, 1985; Nolan *et al*, 1992; Lloyd & Gemmell, 1992). O PM é o principal princípio ativo do medicamento comercial de uso veterinário denominado comercialmente como VERMIVET® (BIOVET VAXXINOVA LTDA). É também um dos principais princípios ativos do DRONTAL® (Bayer S/A).

O PM apresenta uma baixa biodisponibilidade plasmática em humanos, mesmo após a ingestão de altas doses. A concentração maior se mantém no trato gastrintestinal e as reações adversas ocasionadas pelo PM são muito baixas (Fasanmade *et al*, 1994; Bagheri *et al*, 2004). A resistência a drogas tanto em helmintos quanto em protozoários sugerem fortemente o emprego de um tratamento combinado com uma alternativa sólida. Em outros protozoários como *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*, a combinação de drogas já demonstrou resultados satisfatórios na eliminação do parasito (Santa-Rita *et al*, 2005; Bhattacharya *et al*, 2008). No tratamento para aplicação veterinária contra helmintos, as principais opções são o

praziquantel e o PM, normalmente prescritos combinados, contra ancilóstomos, nematódeos e oxiúros (Scorza *et al*, 2006).

O modo bioquímico de ação do PM em *giardia* ainda não está elucidado, mas seu papel na inibição das colinesterases no sistema nervoso de helmintos já está bem descrito (Feng-lin *et al*, 1979). Campanati e colaboradores (2001) mostraram que durante a incubação de trofozoítos de *giardia* com PM a flange ventro-lateral se mostrou degenerada, além de inibir a adesão e o crescimento dos trofozoítos. O trabalho de Barr e colaboradores (1998) sugere que a combinação de PM com praziquantel e febantel, seja uma boa alternativa contra a giardíase em cachorros, devido à redução da eliminação dos cistos de *giardia* durante o tratamento.

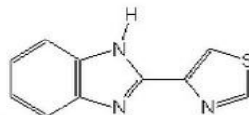


2.3. Albendazol

Inicialmente testado em helmintos em 1982 (Pene *et al*, 1982), o albendazol apresenta um grupo carbamato em sua fórmula molecular, e causa alterações degenerativas no tegumento e nas células intestinais destes parasitos. O seu mecanismo de ação se dá através do sítio da proteína tubulina, o mesmo sítio também sensível à ligação com a colchicina, inibindo assim a polimerização e formação dos microtúbulos. A perda dos microtúbulos citoplasmáticos em helmintos leva a perdas no ganho de glicose tanto nos estágios de larva quanto no adulto, deletando seu armazenamento de glicose. Consequentemente, há diminuição na produção de ATP levando então, à paralisia seguida de morte do helminto (Gao *et al*, 2007).

Em 1986 os primeiros testes com albendazol em *Giardia* demonstraram sucesso (Zhong *et al*, 1986), juntamente com outras drogas da mesma família. Os efeitos ultraestruturais de albendazol em *giardia* foram demonstrados inicialmente por Chavez e colaboradores (1992), em trofozoítos que apresentavam fragmentação do disco adesivo. Além disso, apresentavam a propriedade de se ligarem às microfitas de giardina, evidenciando a ligação do albendazol a uma outra classe de proteínas estruturais exclusivas de *giardia*. Outros estudos corroboraram este mesmo resultado (Reynolson *et al*, 1992; Oxberry *et al*, 1994). No

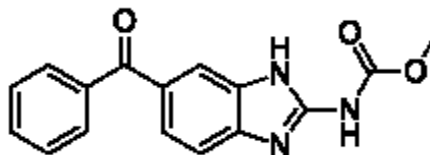
Brasil, albendazole é comumente prescrito contra giardíase, quando o tratamento com metronidazol não foi eficiente.



2.4. Tiabendazol (TB)

O tiabendazol é amplamente utilizado no tratamento do nematódeo *Strongyloides stercoralis* e dos nematelmintos da larva migrans (bicho geográfico) (Mahdi *et al*, 1993; Grover *et al*, 2001). Por pertencer à classe dos benzimidazóis, o TB também atua nos microtúbulos pela ligação seletiva a β -tubulina (a mesma que a colchicina) prevenindo a formação dos microtúbulos em helmintos e protozoários (Martin *et al*, 1997). O TB é considerado a droga que apresenta efeitos colaterais mais graves dentre as demais derivadas de benzimidazóis, embora apresente ótimas taxas de erradicação de parasitoses (revisto em Rosenblatt, 2001).

Os efeitos do TB em protozoários são pouco descritos e em *Tritrichomonas foetus*, embora tenha gerado diversas alterações morfológicas, não impediu a citocinese deste organismo (Carvalho & Gadelha, 2007). Nos dois únicos trabalhos que testaram o TB contra giárdia *in vitro*, os efeitos contra os trofozoítos foram, em menor proporção, quando comparados ao metronidazol ou outros benzimidazóis (Edlind *et al*, 1990; Katelaris *et al*, 1994).



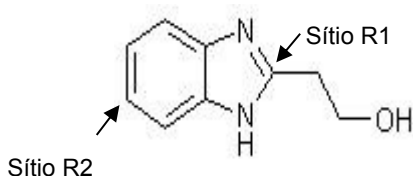
2.5. Mebendazol (MB)

O mebendazol é um benzimidazol desenvolvido mais recentemente e representa um subtipo denominado benzimidazol carbamato, tem sido utilizado tanto em humanos quanto na medicina veterinária, para tratar uma variedade de infestações parasitárias. Acredita-se que seu mecanismo de ação se dá pela ligação aos microtúbulos inibindo o transporte intracelular

de vesículas contendo proteínas no parasito. O metabolismo do MB ocorre predominantemente no fígado (Gotschall *et al*, 1990). Ensaio em humanos mostraram que, após serem degradados, os metabólitos de MB não apresentam atividade parasitária (EMEA, 1999). O MB apresentou-se teratogênico em certas doses em ratos e camundongos, mas não se apresentou teratogênico em porcos, cães, gatos, ovelhas e cavalos (EMEA, 1999).

Segundo Dayan (2003), o MB é rapidamente inativado pelo metabolismo, a partir de sua redução e decarbamilação seguida de conjugação enzimática. Embora cause aneuploidia, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, seus efeitos não são considerados um risco aos humanos, considerando-se que durante a sua administração apresentam baixos efeitos colaterais e, principalmente, devido a sua baixa taxa de absorção pelo organismo. Estudos em indivíduos infectados com *G. lamblia* mostraram que mebendazol foi quase tão eficiente no tratamento quanto os nitroimidazóis secnidazol e metronidazol, e por ser menos tóxico e praticamente não apresentar efeitos colaterais, é uma droga recomendada para tratamento, principalmente nos casos em que haja infecção nematódea coexistente (Sadjjadi *et al*, 2001; Escobedo *et al*, 2003).

2.6. Benzimidazol (BZ)



O derivado original benzimidazol é um composto orgânico aromático heterocíclico. Este componente bicíclico consiste na fusão de um grupo benzênico e um anel imidazole. O composto BZ mais predominante na natureza é o N-ribosil-dimetilbenzimidazol, e está presente compondo parte da vitamina B12, na forma de um ligante entre o cobalto e essa vitamina (Barker *et al*, 1960).

O BZ produzido industrialmente é sintetizado pela condensação de o-fenilenodiamina com o ácido fórmico, além de ser adicionado um metanol em seu sítio de ligação R1 (vide acima a imagem da estrutura molecular).

Nos protozoários *G. lamblia*, *Encephalitozoon intestinalis* e *Cryptosporidium parvum*, foi demonstrado que o BZ se liga a heterodímeros de α - β -tubulina diminuindo a formação de microtúbulos. Quando o BZ é adicionado aos microtúbulos já formados não ocorre despolimerização (MacDonald *et al*, 2004). Os derivados de benzimidazóis que apresentam ligação de um grupo carbamato ao seu sítio R2, têm maior atividade contra protozoários, se

ligando mais especificamente à sub-unidade β -tubulina. Quanto maior a afinidade de um carbamato de benzimidazol a esta subunidade, maior é o seu efeito anti-giárdia (Morgan *et al*, 1993; MacDonald *et al*, 2004).

Nem todos os derivados dos benzimidazóis apresentam atividade anti-parasitária, alguns como o omeprazol e o pantoprazol, que atuam inibindo a bomba de prótons das células parietais do estômago, são derivados de fórmulas moleculares adicionadas de diversos outros compostos.

3 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A giardíase é a segunda causa mais comum de diarreia de origem infecciosa (atrás apenas das infecções bacterianas), é muito frequente em locais onde as condições sanitárias são precárias. O parasitismo estabelecido pela adesão ao epitélio intestinal pode gerar desde uma desnutrição grave a um quadro assintomático, em que o hospedeiro em poucas semanas apresenta cura espontânea. Diversas condições como a virulência do parasito, baixa imunidade do hospedeiro e, principalmente, a resistência do parasito às drogas, têm levado a extensivos esforços na busca de compostos ou combinações de fármacos para maior eficiência no tratamento. As drogas utilizadas neste trabalho foram escolhidas após pesquisas bibliográficas de estudos clínicos utilizando o seguinte critério: efeitos colaterais versus taxa de cura. Entretanto, antes da aplicação clínica, os estudos na biologia celular de giardia sobre o efeito de drogas, bem como avaliar os efeitos utilizando drogas combinadas são fundamentais para compreensão das implicações geradas pelos fármacos tanto sobre a célula hospedeira, a célula epitelial intestinal, quanto na célula infectante, a *Giardia lamblia*. Conforme a busca bibliográfica, as drogas comerciais escolhidas são notoriamente efetivas contra giardia, portanto o foco principal não se fundamenta em identificar a droga mais eficaz contra giardia. Deste modo, este trabalho se fundamentou em um estudo *in vitro* com dois desdobramentos, visando elucidar as seguintes perguntas: *qual ou quais drogas são mais eficazes para inibir o ciclo de vida do parasito?*, ou seja, *é possível que mesmo durante o tratamento as células remanescentes conseguem desencistar e dar continuidade para reinfectar um novo hospedeiro?* Em um segundo momento, direcionado às principais drogas usadas para uso veterinário: *há sinergia entre o metronidazol e o pamoato de pirantel?*, ou seja, como é de conhecimento científico que o metronidazol acarreta em fortes efeitos colaterais, como a inflamação da mucosa intestinal, *é possível diminuir a concentração de metronidazol quando combinado com outra droga, mantendo o mesmo efeito anti-giardia sem afetar as células epiteliais intestinais?* Portanto, este estudo se justifica por preencher esta lacuna na literatura e apresenta os resultados na forma de artigos recentemente publicados.

4 OBJETIVO

Analisar a ação de benzimidazóis sobre a diferenciação do protozoário *Giardia lamblia* e o efeito combinado de metronidazol e pamoato de pirantel durante a interação parasito e células epiteliais intestinais (IEC-6).

4.1 Objetivos específicos

- Analisar a ação de benzimidazóis sobre a diferenciação do protozoário *Giardia lamblia*, considerando-se as taxas de encistamento e de desencistamento;
- Avaliar o efeito desses compostos na ultraestrutura do parasito por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.
- Testar concentrações combinadas de metronidazol e pamoato de pirantel sobre o crescimento de giárdia, estabelecendo a partir de isoblogramas o tipo de efeito (sinérgico, antagônico ou aditivo) das drogas sobre o parasito;
- Avaliar a toxicidade dessas drogas combinadas em diversas concentrações em monocamadas de IEC-6 não infectadas, a partir de ensaios colorimétricos;
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura os efeitos morfológicos das concentrações consideradas sinérgicas durante a interação parasito-IEC-6.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira etapa deste trabalho, a seguinte metodologia foi empregada:

5.1. Cultura de células

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* da cepa WB (ATCC 30957) foram cultivados em frascos tipo falcon de 15mL até a fase log em meio TYI-S-33, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100µg/mL de bile bovina sem adição de vitaminas ou antibióticos (Keister, 1983). As culturas foram mantidas em incubadora de células à 37°C suprida com atmosfera de CO₂ à 5%. A passagem das culturas ocorreu a partir da soltura dos trofozoítos aderidos pelo método de choque térmico em gelo durante 10 minutos. Aliquotas do sobrenadante contendo os trofozoítos livres foram transferidas para novos frascos contendo meio TYI-S-33 recém preparado em pH neutro.

5.2. Encistamento

O processo de diferenciação em cistos ocorreu através de algumas modificações do protocolo de Boucher & Gillin, 1990 e Kane et al. 1991. Como reportado por Hausen et al, 2006, o processo de encistamento foi dividido em duas fases. A primeira teve duração de 18h (fase I) e a segunda de 7h (fase II). Após o período 18 + 7h, trofozoítos e cistos foram contados em câmara de Neubauer. Como durante o processo de encistamento gera cisto viáveis (tipo I) e inviáveis (tipo II) facilmente distinguíveis pelo constraste de fase, a classificação dos cistos ocorreu pela observação por microscopia de constraste interferencial (modo DIC) com objetivas de alta resolução (63x plan-apochromatic). Os cistos foram classificados como viáveis ou não de acordo com o critério estabelecido por Gillin et al, 1989. Adicionalmente, o critério de exclusão por marcação via corante de viabilidade também foi utilizado pela coloração das células com azul de trypan à 0.4%, conforme previamente descrito por Meng et al, 1993.

5.3. Ensaios com drogas

Os benzimidazóis utilizados no primeiro desdobramento do trabalho foram: albendazol (AB), mebendazol (MB), benzimidazol (BZ) e tiabendazol (TB). Todos estes fármacos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 0, 0.1, 1, 5 e 10µg/mL, sendo 0, o grupo controle contendo apenas a mesma diluição de DMSO no meio de cultura, o qual não demonstrou apresentar nenhum efeito sobre *Giardia*. As drogas nestas concentrações foram adicionadas na fase I apenas ou na fase I e II do processo de diferenciação em cistos. Durante o processo de desencistamento, nenhuma droga foi adicionada. Todos os experimentos foram conduzidos em placas de 24 poços contendo 2 x 10⁵ trofozoítos/mL. Após a diferenciação contendo os fármacos, as amostras foram submetidas a avaliação por DIC, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a avaliação por microscopia eletrônica, as células foram fixadas em Karnovski overnight e processadas conforme a literatura convencional para estas técnicas (Bozzola & Russell, 1999). As amostras foram observadas no LABMEL-UERJ nos microscópio eletrônicos de transmissão e no microscópio eletrônico de varredura.

5.4. Avaliação da inibição do encistamento

Foi aplicado o cálculo estabelecido em trabalho anterior (Hausen, et al, 2006), em função da redução do número original de trofozoítos diferenciados. Desta forma, foi possível estabelecer uma correlação entre a quantidade de cistos obtidos no controle, pelo número de cisto obtidos nos ensaios contendo drogas. Portanto, foi estabelecida uma razão de função dos valores médios obtidos nos controles para se estabelecer uma taxa de inibição das células que não sofreram a diferenciação de cistos em trofozoítos. Os cálculos foram realizados conforme as duas fórmulas abaixo descritas:

$$\text{Fórmula 1: } N_c = T_d \times R_c / T$$

Sendo que N_c é o número de cistos viáveis que seriam obtidos hipoteticamente a partir de experimento controle, T é o número inicial de trofozoítos submetidos a diferenciação, e T_d é o número final de trofozoítos remanescentes após a diferenciação, enquanto que R_c é número real de cistos diferenciados e viáveis. Assim, ao obter o valor N_c com a fórmula 1,

este dado é incorporado a fórmula 2 para se obter o percentual de redução da diferenciação em cistos viáveis comparavelmente ao controle.

$$\text{Fórmula 2: } R = N_c - N_d$$

Portanto, nesta segunda fórmula, R é o valor percentual da redução na produção de cistos viáveis, enquanto que Nd é o percentual de cistos obtidos durante o ensaio com as drogas. Os valores de R foram comparados entre todos os grupos conforme o teste estatístico de Dunnett realizado no software Graphpad Instat, no qual se estabeleceu o valor de $P \leq 0.05$ como sendo estatisticamente significativa.

5.5. Avaliação da eficácia do desencistamento

Após o processo de encistamento in vitro realizado, todas as células em suspensão foram submetidas à choque hipotônico em água destilada estéril overnight em geladeira. Após este período, os cistos viáveis foram contados e submetidos ao desencistamento. Algumas modificações no protocolo padrão de duas etapas desenvolvido por Boucher e Gillin (1990) foram realizados conforme descrito a seguir: na primeira etapa os cistos foram incubados em HBSS contendo cisteína e glutathione sob pH alterado com HCL 1N para 2,5 durante 40min. Após este período, as células foram centrifugadas em baixa rotação (800g/5min) e colocadas em solução salina de Tyrode contendo tripsina à 1mg/mL em pH 8 por mais 1h. Em seguida, foram centrifugadas novamente e o pellet obtido foi ressuspensionado em meio recém preparado TYI-S-33 por 24 e 96h à 37°C. Após o tempo estabelecido, os trofozoítos recém formados e aderidos foram submetidos a choque térmico em gelo por 10min para soltura do tubo, centrifugados e contados em câmara de Neubauer.

Na segunda etapa deste trabalho, o seguinte desdobramento metodológico é descrito a seguir:

5.6 Co-cultura de Giardia e IEC-6

A cultura de células convencional de trofozoítos de Giardia lamblia ocorreu conforme o item anterior para a primeira etapa deste trabalho. Adicionalmente, nesta segunda etapa

deste trabalho foram realizadas predominantemente co-culturas de *Giardia* com a célula hospedeira para mimetizar *in vitro* o processo de parasitismo deste protozoário, neste caso, as células epiteliais intestinais são as hospedeiras do parasitismo estabelecido por *Giardia*, no qual os trofozoítos aderem às suas microvilosidades preferencialmente via disco adesivo pela região ventral. Deste modo, o modelo celular imortal IEC-6 (do inglês, intestinal epithelial cells type 6) obtido de cripta de rato, foi utilizado neste trabalho. As IEC-6 foram cultivadas rotineiramente em meio DMEM suplementado com 1 U/ 1mL de insulina regular humana e 10% de soro fetal bovino, sem adição de antibióticos. As passagens ocorreram após as células atingirem subconfluência com tripsina e cultivadas a frascos de 25cm² à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. As células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Morgado Diaz (INCA-RJ). Para os experimentos, as IEC-6 foram adicionadas nas concentrações de 0.8×10^4 ou 1×10^5 células em cada poço de placas 24 ou 96 poços, respectivamente. Após 24h de cultura nas placas de 24 poços, os trofozoítos foram adicionados na concentração de 2×10^5 células/poço, ou seja, em uma relação em torno de 2:1 trofozoítos para cada célula intestinal. Após 24h em co-cultura entre trofozoítos e células IEC-6, no qual o meio para co-cultura foi modificado para viabilizar a sobrevivência de ambos tipos celulares, o o meio DMEM suplementado para as células intestinais foi adicionado de 0.95% de caseína e 0.07% de L-cisteína, conforme descrito por Gadelha et al, 2007. Dentro deste período de 24h em co-cultura os ensaios foram realizados contendo diversas concentrações de metronidazol (MZ) ou pamoato de pirantel (PM) combinados ou não. Os ensaios em placas de 96 poços foram realizados apenas com trofozoítos contendo as drogas combinadas ou não.

5.7. Determinação de IC50 e FICI

As concentrações testadas para se estabelecer 50% da viabilidade das células (IC50) foram avaliadas durante o período de 24h. Soluções estoque de MZ e PP foram diluídas em dimetilsulfóxido nas concentrações de 60mM e 20mM, respectivamente.

Para determinar se houve efeito sinérgico, os parasistas foram cultivados por 24h e o índice de concentração inibitória fracionada (FICI, do inglês, fractional inhibitory concentration index) foi calculado pela equação, conforme descrito por Hallander et al, 1982:

$$FICI = (IC_{50} \text{ da dose ótima de MZ com dose-subótima de PM} / IC_{50} \text{ do MZ apenas}) + (IC_{50} \text{ da dose ótima de PM com dose sub-ótima de MZ} / IC_{50} \text{ do PM apenas})$$

Deste modo, foram obtidos isobologramas clássico pela combinação das drogas combinadas ou não, dentro de uma inibição de crescimento de 50% em 24h. De acordo com a literatura (Odds, 2003), o efeito sinérgico é identificado quando o $FICI \leq 0.5$. Entre 0.5 – 4.0 é considerado que as drogas combinadas não apresentam interação (efeito aditivo), e quando o $FICI < 4$, é considerado que o efeito combinatório das drogas é antagônico.

5.8 Avaliação da viabilidade de IEC-6 em combinação com as drogas

IEC-6 não infectadas com *Giardia* foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com as duas drogas combinadas ou não por 24h e a toxicidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), o MTT é convertido em formazan pela atividade mitocondrial das células e o produto de sua conversão gera um pigmento de absorvância detectável por espectrofotometria colorimétrica em leitor de microplacas, conforme já descrito por Mosmann, 1983. Após o período de 24h em cultura, o meio foi retirado e as células foram submetidas a mais 4h em cultivo de meio DMEM contendo 0.5mg/mL de MTT à 37°C. Após este período, o meio foi retirado e foi adicionado DMSO para revelar o formazan. Após homogeneização, as placas contendo as amostras foram lidas no leitor de microplacas VersaMax à 490nm.

6 RESULTADOS

6.1 *Giardia lamblia*: a report of drug effects under cell differentiation (Artigo publicado)

Parasitol Res
DOI 10.1007/s00436-009-1463-4

ORIGINAL PAPER

Giardia lamblia: a report of drug effects under cell differentiation

Moema A. Hausen • Richard Pereira de Oliveira • Ana Paula Rocha Gadelha •
Loraine Campanati • Jorge José de Carvalho • Laís de Carvalho •
Helene Santos Barbosa

Received: 13 March 2009 / Accepted: 24 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The *Giardia lamblia* life cycle is characterized by two phases during which two major cell differentiation processes take place: encystation and excystation. During encystation, the trophozoites transform into cysts, the resistance form. Once ingested by a susceptible host, the cysts are stimulated to excyst in the stomach, and the excysted trophozoites adhere to the epithelium of the upper small intestine. Our work analyses the effects of four benzimidazole derivatives during *Giardia* differentiation into cysts and evaluates the excystation efficiency of water resistant cysts. Albendazole (AB) showed the most significant results by inhibiting encystation about 30% and a decreasing rate of excystation efficiency. The ultrastructural organization of the cyst adhesive disk was notably affected by AB treatment. Although other benzimidazoles showed some effect on encystation, they were not able to inhibit the excystation process. It is known that the benzimidazoles affect the cytoskeleton of many organisms but how it interferes in *Giardia* differentiation processes is our main focus. The importance of studying *Giardia*'s differentiation under drug action is reinforced by the following arguments: (1) Cysts eliminated by hosts undergoing treatment could still be potentially infective; (2) once the host has been treated, it would be desirable that the shedding of cysts into the environment is avoided; (3) the prevention of *Giardia* dissemination is a question of extreme importance mainly in underdeveloped countries, where poor sanitary conditions are related to high rates of giardiasis. This report concerns the importance of keeping the environment free from infective cysts and on *Giardia*'s drug resistance and differentiating abilities.

logical and physiologically different stages: the dormant and resistant cyst and the motile trophozoite, which represents the vegetative/reproductive stage. The attachment of the trophozoites to the epithelial lining of the intestine is probably mediated by its ventral adhesive disk and flagellar beating (Holberton 1973; Campanati and Monteiro-Leal 2002). The resistant cyst is oval-shaped, is surrounded by a thick cyst wall, and can remain infective for long periods once it is released by the host (Adam 2001). The encystation of trophozoites is required for survival outside the host organism. The encysted cells maintain their infectivity by resistance to hypotonic lysis and disinfection (Reiner et al. 1995). The excystation step, which leads to the release of trophozoites, has also been applied to questions of epidemiology (Isaac-Renton et al. 1992). During treatment against giardiasis, some hosts can continue to eliminate cysts in stools although less and less until eradication (Olson et al. 1996; Keith et al. 2003), meaning that it takes some time for it to be cleared from the infection and also not to be a source of contamination for others.

The trophozoite form has usually been used as the experimental model for the test of several drugs intended to treat giardiasis because this form is the one responsible for host injury and symptoms (Gardner and Hill 2001; Campanati and Monteiro-Leal 2002; Cruz et al. 2003). However, to determine the effectiveness of the drugs that could act against all *G. lamblia* life cycle stages, we developed a model which takes into account the effects of drugs over the differentiation processes that this cell undergoes (Hausen et al. 2006). Also, we successfully demonstrated the effects of drugs inhibiting cyst formation in vitro. The importance of this analysis has already been pointed out by Jarroll and Sener (2003), who argued that it is not known whether chemotherapeutics could also block the shedding of cysts. The prevalence of giardiasis can reach 18% in underdevelopment countries, where the main sources of contamination are interpersonal transmission and poor sanitary conditions (Teixeira et al. 2007). Many studies have shown that benzimidazoles prevent *Giardia* trophozoite from attaching to a substrate (Cruz et al. 2003; Morgan et al. 1993). In the in vivo environment, as the trophozoites travel down the intestine, they trigger parasite differentiation (Luján et al. 1997), while in vitro, according to Faubert et al. (1991), when encystation media is added, most encysting trophozoites remain attached until they begin to round up. If the host is being treated, the trophozoites will most likely detach, and some will die but others will pass through the lower portions of the small intestinal tract, triggering their encystation process. This situation generates the following question: Are the eliminated cysts still infective even when the host is being treated?

In order to verify if the parasites maintain their infectious abilities, we evaluated in an in vitro model the effect of four benzimidazole compounds over the full life cycle of the parasite, including the encystation and excystation processes. The effect of the drugs on *Giardia* morphology was investigated by light and electron microscopy. Also, we examined the efficiency excystation of cysts previously differentiated by albendazole, mebendazole, benzimidazole, or thiabendazole treatment.

Material and methods

Unless otherwise stated, all reagents were obtained from Sigma Chemical, St Louis, MO, USA.

Cell culture and encystation

Trophozoites of *G. lamblia* (WB strain, ATCC 30957) were grown up to log phase in TYI-S-33, supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1 mg/mL of bovine bile, without added vitamins and antibiotics (Keister 1983). Subcultures were produced two or three times a week by chilling the glass tubes on ice and removing an aliquot from the medium containing the cells and transferring it to tubes with fresh medium. *G. lamblia* was induced to encyst, with some modifications to the methods previously published (Boucher and Gillin 1990; Kane et al. 1991). As reported in our previous work (Hausen et al. 2006), the encystation process was divided in two phases of 18 h (phase I) and 7 h (phase II). After that period, the number of cells (trophozoites and total number of cysts) was quantified using a Neubauer chamber. The cells were observed by phase and differential interference contrast (DIC) using a $\times 63$ plan-apochromat objective and digitalized, and the mature cysts were classified as viable or not following the typical cell morphology criteria (Gillin et al. 1989) and also by dye exclusion with trypan blue 0.4% (Meng et al. 1993).

Drug assays

The benzimidazoles derivatives albendazole (AB), mebendazole (MB), benzimidazole (BZ), and thiabendazole (TB) were all diluted in dimethylsulfoxide at concentrations of 0 (control), 0.1, 1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$. The final concentration of solvent did not exceed 1%, which had no effect per se on the parasites. In the 18 h of the first phase occurs the most remarkable changes in trophozoite morphology, initiating with the observation of encystation secretory vesicles and accomplishing the phase with rounded and detached cells. In the small period of 7 h of step 2, the peripheral birefringency due to cyst wall components release is the

notable characteristic observed by DIC, which as an average result for this methodology reaching a total amount of 50% of viable cysts (Hausen et al. 2006). An aliquot of 2×10^5 trophozoites/mL was induced to encyst in the drug-containing medium either into the first step of encystation only or through both steps of differentiation. An aliquot of 2×10^5 trophozoites/mL was induced to encyst in the drug-containing medium either into the first step of encystation only or through both steps of differentiation. No drug was added during the excystation process. Cells under the effect of drugs were morphologically analyzed by DIC, transmission electron microscopy (TEM), and scanning electron microscopy (SEM).

Inhibition of encystation

Although there was a significant reduction in the number of trophozoites as a result of the drug treatment, which reduced the original number of encysting cells, the inhibition of encystation was calculated as detailed described previously (Hausen et al. 2006). The encystation-inhibition rate was reached by using two formulae, which established a correlation between the number of cysts in control experiments and the number of cysts found in the drug assays.

$$N_c = \frac{T_d \times R_c}{T} \quad (1)$$

$$R = N_c - N_d \quad (2)$$

In Eq. 1, N_c is the number of viable cysts obtained hypothetically as derived from control experiments, T is the number of trophozoites obtained after the treatment (T_d) and the real number of cysts counted in the control assay. In Eq. 2, R is the percentage of reduction in the production of cysts type I compared to control, and N_d is the percentage of cysts type I obtained after the drug treatment.

Excystation efficiency

After the encystation process, the non-encysted cells were ruptured by hypotonic shock in sterile double distilled water overnight at 8°C. The viable cysts were counted and induced to excyst. The excystation process was carried out with some slight modifications in time and pH in the three-step method as previously described by Boucher and Gillin (1990). During the first step, cysts were incubated for 40 min with HBSS containing cysteine and reduced glutathione at pH 2.5, followed by the second step of 1 h at pH 8 in Tyrode's salt solution containing trypsin at 1 mg/mL and finally incubated with fresh TYI-S-33 for 24 and 96 h at 37°C for trophozoite release and the establishment of a new culture. The tubes were cooled on ice for 10 min for trophozoites detachment and then centrifuged, and cells were counted in a Neubauer chamber.

Transmission electron microscopy

After encystation in the medium containing the drugs, cysts were washed twice with distilled water and then fixed for 24 h with Karnovsky fixative diluted in Na-cacodylate buffer. After that, the cells were post-fixed for 30 min with 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded series of ethanol, and embedded in epoxy resin. Thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed by TEM (LEO 906E).

Scanning electron microscopy

After encystation under the effects of the drugs, water resistant cysts were added to Karnovsky fixative for 1 h. Cells were washed with distilled water and allowed to adhere for 10 min on cover slips pre-treated with 1% poly-L-lysine. They were then washed with PBS, post-fixed for 30 min in 1% osmium tetroxide, and dehydrated with increasing concentrations of ethanol. Samples were then critical point-dried with CO₂, coated with gold, and observed by SEM 940 (Zeiss) operating at 15 kV.

Table 1 Inhibition of encystation according to drug action during differentiation in phase I (18 h with drug plus 7 h without drug action)

Drug concentration	AB (IE% ± SD%)	MB (IE% ± SD%)	BZ (IE% ± SD%)	TB (IE% ± SD%)
0 (control)	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0
0.1 µg/mL	33.14±8.3*	2.71±5.8 ^{ns}	1.06±6.1 ^{ns}	2.22±1.7 ^{ns}
1 µg/mL	33.46±7.5*	2.69±14.0 ^{ns}	0.63±12.6 ^{ns}	3.59±2.4**
5 µg/mL	31.78±5.7*	2.50±10.0 ^{ns}	0.85±4.5 ^{ns}	4.17±1.7**
10 µg/mL	33.7±12.0*	3.34±13.0**	0.81±6.6 ^{ns}	3.93±1.8**

Data are expressed in mean values of six experiments

IE percentage of inhibition of encystation, SD percentage of standard deviation, ^{ns} not significant

* $P < 0.0001$; ** $P < 0.05$, significant differences from the control values

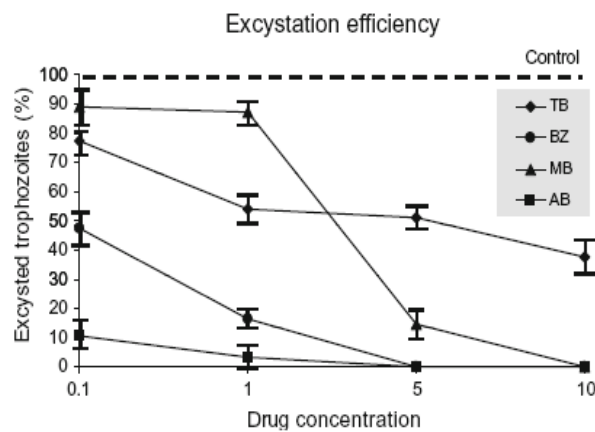


Fig. 1 Percentage of excystation rate compared to control (dashed line), which was raised from a real 10% rate to 100% for improved visualization. The cysts obtained in drug conditions were collected and induced to excyst. The effectiveness of each drug was observed by a decrease in the percentage of quantified trophozoites

Results

Inhibition of encystation

Our statistical results (Dunnet multiple comparison test) showed that AB was the most effective drug for inhibiting the differentiation of trophozoites into viable cysts, displaying a non-dose-dependent inhibitory rate of 33% for all

concentrations used (Table 1). We observed no statistical difference in the number of viable cysts when drugs were added to the encystation medium during both phases (18 h plus 7 h).

Excystation efficiency

Excystation efficiency was measured as the ability of cysts to generate trophozoites, which is capable of attaching. As described before, encysted trophozoites were grown in medium containing the benzimidazole derivatives during phase I only or in both phases of encystation. The cysts were then stimulated to undergo the excystation process. The assays in which the control reached 10% of excysted cells after 24 h and established a new culture after 96 h were included in the statistical analysis. Albendazole was the most effective drug since we only observed cysts capable of excystation in cultures treated at 0.1 μg/mL. Although less effective than AB, all the other drugs except TB were considered significant when compared to the control (Fig. 1).

Microscopy analysis

After the encystation process in medium containing the benzimidazole derivatives, the cysts were observed by DIC.



Fig. 2 Light microscopy images of a recently encysted *Giardia* obtained after albendazole treatment under the first phase (18 h) of encystation. By DIC at the concentration of 0.1 μg/mL, **a** shows a sequence of the same cyst observed under three different focal planes. The fragmented adhesive disk (arrow) can be distinctly observed as several sheets organized into a “horseshoe” shape. After digitally processing **a** using a border enhancing filter, the new image (**b**) showed the adhesive disk and the cyst wall clearly visualized. **c** and **d**

After treatment at the highest concentration of 10 μg/mL, the cyst wall continued to be distinctly highlighted (white arrow in **d**), the horseshoe-shaped adhesive disk (arrowhead in **c**) was observed as a slight shadow by DIC (**c**) and was not detected by the border enhancing filter (**d**). There was no morphological difference in the adhesive disk observed by DIC at the lowest concentration of AB compared to controls. The images of this assay were acquired at the same time under the same bright and contrast conditions. Bars 5 μm

The effect of AB on the general morphology was concentration dependent. The cysts exhibited externalized flagella and the adhesive disk was less evident (Fig. 2). Additionally, bubble-like structures outside the cysts and large vacuoles in cytoplasm were noticed, and based on morphological criteria, a slight increase in the number of unviable cysts was detected with AB (data not shown).

By SEM, the main morphological alterations due to AB were irregularities such as the uneven appearance and pore-like structures in the cyst wall. Figure 3a–d show the AB effects in detail. By TEM, control cysts present the typical structural architecture of the *Giardia* mature cyst in which the fragmented adhesive disk and the internalized flagella are distinctly observed. Another feature of cyst maturity is the thickness of the wall (0.3 to 0.5 μm), homogeneously dispersed around the cytoplasm (Fig. 4a and b). As observed by TEM, AB disrupted the adhesive disk structure (Fig. 4c–f). Although observed in high quantity by DIC and SEM, we did not observe in our TEM sections the externalized flagella in the cysts in which differentiation was carried out with AB. Except for the adhesive disk and the externalized flagella, no other cytoskeleton structure was affected by AB.

Discussion

Since AB was the most effective of the four benzimidazole derivatives evaluated on the encystation and excystation processes, it was chosen for a more detailed analysis on the cytoskeleton structures.

It was demonstrated that during the encystation process the cell disassembles the adhesive disk in four distinct parts disposed in pairs around each nuclei (Palm et al. 2005). Our results demonstrated that with AB, microtubule aggregates disassociated from the adhesive disk were randomly dispersed in the cytoplasm, which differs from their usual localization. Similar results were observed by others groups but on trophozoites under the effect of AB (Chávez et al. 1992) and under nocodazole effects (Mariante et al. 2005). Intriguingly, our results showed mature and apparently viable cysts presenting completely loss of adhesive disk organization (Fig. 4f), suggesting that the cells were resisted to the drug and reached the cystic form, carried out the damages to the cyst. The term resistance is usually employed when an organism develops any metabolic or structural pathway to avoid the deleterious effects of a drug, which also depends on virulence factors (Upcroft and

Fig. 3 SEM images of **a** control cyst presenting homogeneous cyst wall (CW) and **b–d** cysts that differentiated with 0.1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$ of albendazole, respectively. **b** Pore-like structures (arrows) are observed. **c** Bubbles (arrowheads) above the shrunken cyst wall, **d** external flagella (arrows). The bubbles and the outer flagella are usually present in higher concentrations. Bars 3 μm

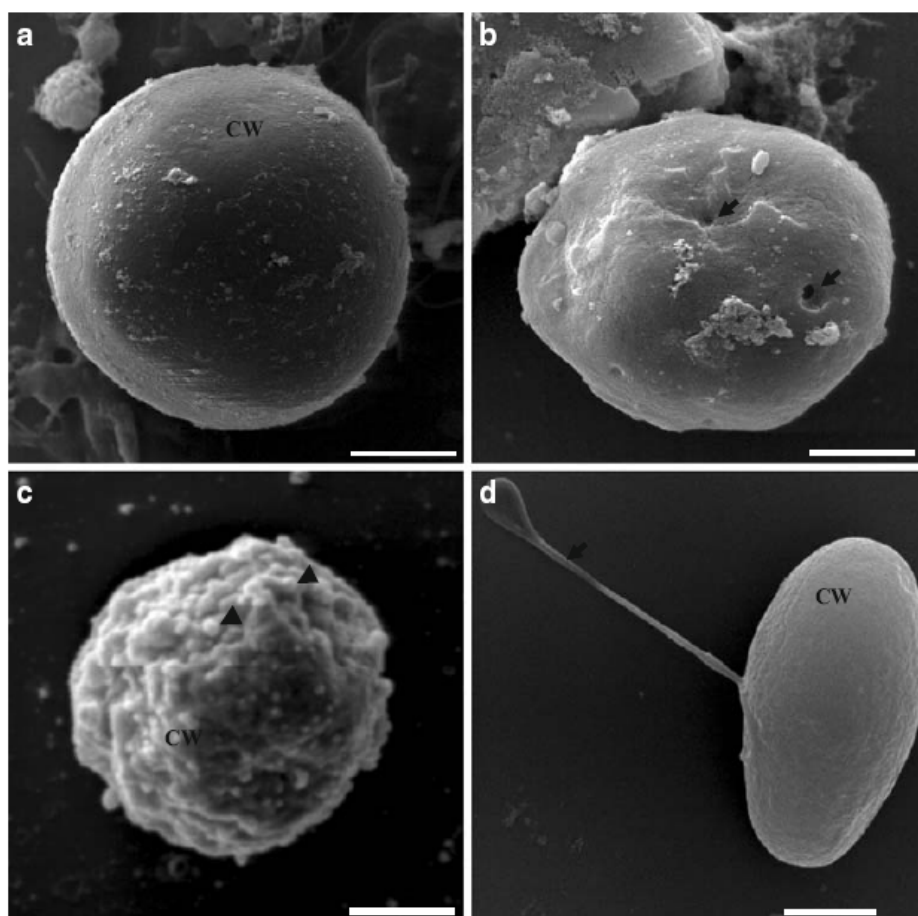
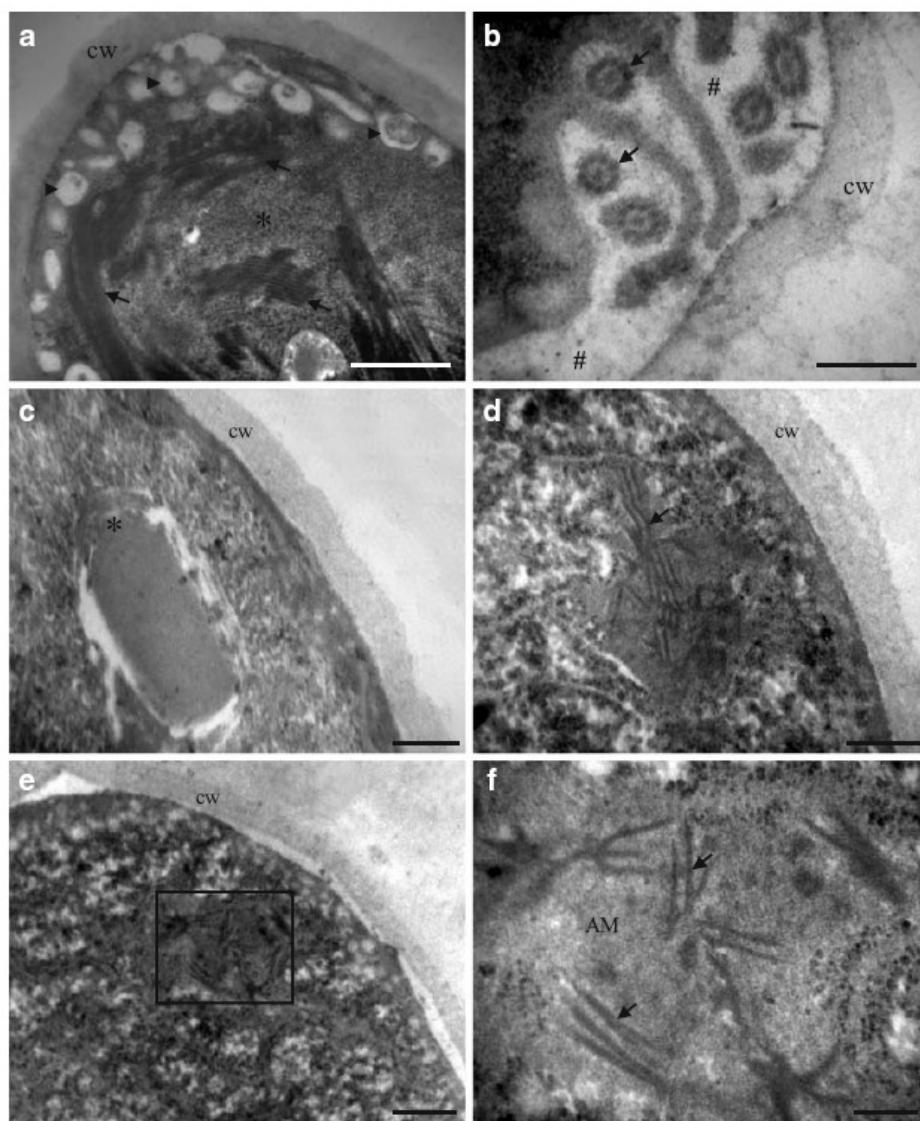


Fig. 4 TEM images of control cysts showing **a** homogeneous glycogen granules dispersed in cytoplasm (*asterisk*) and fragmented adhesive disk (*arrows*). The peripheral vesicles (*arrowheads*) are located surrounding the cyst wall (*CW*). **b** Internalized flagella (*arrows*) in peritrophic space (*number sign*). Effects of albendazole on *Giardia* mature cysts which went through differentiation in drug-containing medium in the step 1. **c** Electron dense and lamellar bodies (*asterisk*) are seen in the concentration of 0.1 $\mu\text{g/mL}$. **d, e** Adhesive disk (*arrow*) disassembly observed at concentrations of 1 and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **f** High-magnification image from selected area in **e** showing amorphous material (*AM*) around the disorderly organized adhesive disk microtubules (*arrows*). Bars **a, b** 1 μm , **c–e** 500 nm, and **f** 150 nm



Upcroft 2001). Since differentiation is critical for *Giardia* as explained before, it was considered here that this capability for reaching the cystic form even under drug effects could be somehow a kind of resistance and adaptation that allows the encystation process to occur even in adverse host conditions. This adaptation, which exhibited the same inhibitory rate in all AB concentrations, was compared to the IC_{50} values obtained for trophozoites in the literature (Cruz et al. 2003; Cedillo-Rivera and Muñoz 1992). We verified that in order to obtain an IC_{50} to inhibit the encystation, the concentration needed would probably kill the great majority of the trophozoites in the initial periods of encystation. Encysting trophozoites have their exo/endocytic pathways completely modified, i.e., the pathways for production of the cyst wall proteins are activated and the transport of many molecules decrease,

such as glucose (Touz et al. 2008; Gottig et al. 2006; Reiner et al. 2001), explaining the low activity of albendazole on the cyst formation.

To support our hypothesis of resistance, although the increasing concentrations of AB generated the same percentage of cysts (Fig. 1), the number of morphological damages increased progressively according to dosage (Fig. 2c–d and 4d and f). Despite the higher inhibition of encystation in the presence of AB than with others drugs, in all AB concentrations, the ability to synthesize/release the cyst wall components was not progressively lost under AB effects in the cells that could reach a mature cystic form (Fig. 2c–d). Also, in Fig. 4f, microtubules were observed around a deposit of amorphous material. We speculate that the nature of this material is depolymerized tubulin, and this will be the focus of our next analysis for immunolab-

eling cytoskeleton proteins. The gradual dispersion of microtubules, depending on the AB concentration used, probably explains the low efficiency rate in the excystation procedures.

A similar study was made using mature cysts recovered from stools (Bernal-Redondo et al. 2004), the cysts were exposed to AB and then allowed to go through excystation without drug. These authors did not observe any alteration in the cysts treated with AB. Besides its known effects on *Giardia* trophozoites and based on the data of Bernal-Redondo et al. (2004), we suggest that the AB effects described here could be restricted to the encystation process when cell is metabolically more active and have not fully developed its cyst wall. The lack of AB effects on the mature cyst as observed by Bernal-Redondo et al. (2004) could be most likely due to the low penetration of the drug through the cyst wall or even by the cyst lower metabolic activity to absorb the drug. The excystation analysis of mature cysts treated with AB did not show a satisfactory rate, reaching 0% of excystation efficiency at 10 µg/mL as also demonstrated elsewhere (Bernal-Redondo et al. 2004) in the recovered cysts from stools of patients under AB treatment. Our results showed that during excystation of *Giardia*, AB had the same effect (0% efficiency) at a concentration 10-fold lower.

The video-microscopy observations of encysting cells in medium containing AB showed that between each medium replacement, the majority of cells revealed the typical structures usually observed during encystation process, as previously described and recently reviewed (Uproft and Uproft 2001). Interestingly, after the differentiation period of cyst generation, the number of cysts decreased when compared to controls, while a small increase in the number of unviable cysts was noted. Many non-encysted trophozoites showed intermediate characteristics between cysts and trophozoites, such as rounded-shape, encystation secretory vesicles, peripheral birefringence, and motile flagella.

The cytoskeleton is essential for differentiation, and it is mostly based on microtubular structures (Campanati et al. 2003). Albendazole is a benzimidazole derivative, in which its effects on the *Giardia* cytoskeleton are notorious (Hall and Nahar 1993; Cruz et al. 2003). It was shown that in protozoans, the benzimidazoles derivatives bind to $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers of assembling microtubules, thus arresting polymerization, while binding to assembled microtubules generated depolymerization (MacDonald et al. 2004). Albendazole was also shown to bind to *Giardia* β -tubulin, disturbing microtubule polymerization on trophozoites (Edlind et al. 1990). During *Giardia* encystation, there is no assembling, but disassembling of the adhesive disk while in excystation a rapid assembling of this structure is followed by cytokinesis (Palm et al. 2005). Hence, we

suggest that AB bound to cysts tubulin and strongly interfered in the excystation (0% efficiency), while it did not interfere so much in encystation (33% inhibition of differentiation). Based on the known action of the benzimidazoles derivatives described above and on our results, this probably explains why the encystation was less inhibited than excystation.

Clinical studies have already suggested AB alone or together with mebendazole or metronidazole for treating giardiasis (Reynoldson et al. 1991; Cedillo-Rivera and Muñoz 1992). Also, as few as ten to 25 cysts ingested are sufficient to cause infection (Vesey and Peterson 1999). According to these authors, more important than treatment is prevention, but when the patient is infected with *Giardia*, metronidazole or AB are the main medical options.

In the literature, there is a lack of information of how infective the cysts that are shed by patients during treatment are. Herein, we propose that the design of drugs against giardiasis should aim not only the trophozoites stage but all other phases of *Giardia*'s differentiation. It is now clear that any of the benzimidazoles tested here do not act in the encystation process by the same way it affects the trophozoites, and this condition must be done on account during treatment. This would include the analysis of a safe treatment for both the patient and the environment. Our work with AB, the most effective drug for *Giardia*, as previously described, brings to light two new subjects related to *Giardia* differentiation: (1) how AB affects *Giardia* differentiation; (2) the establishment of a new model for evaluating drug effects in the cell biology of *Giardia*: its differentiation process. Based on the previous topics and on our data, this paper contributes to the study of the cell biology of this parasite, with the specific approach to its differentiation under drug treatment, demonstrating its interference on the cyst cytoskeleton assembly.

Acknowledgments This work is dedicated to the memory of Professor Luiz Henrique Monteiro Leal. The authors thank Dalva Lira for technical assistance in cell culture and to Mr. David G. Straker for reviewing the English. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Sub-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa (SR2-UERJ), Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). The experiments were performed in accordance with the established by the Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents (NACLAR).

References

- Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 14:447–475
- Bernal-Redondo R, Martínez-Méndez LG, Mendoza-Chavez A, Velasco-Perales D, Chavez-Munguia B (2004) Evaluation of the

- in vitro effect of albendazole, metronidazole and nitazoxanide on viability and structure of *Giardia lamblia* cysts. *J Submicrosc Cytol Pathol* 36:241–245
- Boucher SM, Gillin FD (1990) Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun* 58:3516–3522
- Campanati L, Monteiro-Leal LH (2002) The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitol Res* 88:80–85
- Campanati L, Troester H, Monteiro-Leal LH, Spring H, Trendelenburg MF, de Souza W (2003) Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Histochem Cell Biol* 119:323–331
- 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
- Chávez B, Espinosa-Cantellano M, Cedillo Rivera R, Ramírez A, Martínez-Palomo A (1992) Effects of albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch Med Res* 23:63–67
- Cruz A, Sousa MI, Azeredo Z, Leite E, Figueiredo de Sousa JC, Cabral M (2003) Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother* 51:1017–1020
- Edlind TD, Hang TL, Chakraborty PR (1990) Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *J Infect Dis* 162:1408–1411
- Faubert G, Reiner DS, Gillin FD (1991) *Giardia lamblia*: regulation of secretory vesicle formation and loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Exp Parasitol* 72:345–354
- Gardner TB, Hill DR (2001) Treatment of Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 14:114–128
- Gillin FD, Boucher SE, Rossi SS, Reiner DS (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
- Gottig N, Elías EV, Quiroga R, Norez MJ, Solari AJ, Touz MC (2006) Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 281:18156–18166
- Hall A, Nahar Q (1993) Albendazole as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87:84–86
- Hausen MA, Freitas-Jr JC, Monteiro-Leal LH (2006) The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. *Exp Parasitol* 113:135–141
- Holberton DV (1973) Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J Cell Sci* 13:11–41
- Isaac-Renton JL, Shahriari H, Bowie WR (1992) Comparison of an in vitro method and an in vivo method of *Giardia* excystation. *Appl Environ Microbiol* 58:1530–1533
- Jarroll EL, Sener K (2003) Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. *Drug Resist Update* 6:239–246
- Kane AV, Ward HD, Keusch GT, Pereira ME (1991) *In vitro* encystation of *Giardia lamblia*: large-scale production of *in vitro* cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *J Parasitol* 77:974–981
- Keister DB (1983) Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77:487–488
- Keith CL, Radecki SV, Lappin MR (2003) Evaluation of fenbendazole for treatment of *Giardia* infection in cats concurrently infected with *Cryptosporidium parvum*. *Am J Vet Res* 64:1027–1029
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE (1997) Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:294–304
- MacDonald LM, Armson A, Thompson AR, Reynoldson JA (2004) Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol* 138:89–96
- Mariante RM, Vancini RG, Melo AL, Benchimol M (2005) *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Exp Parasitol* 110:62–72
- Meng TC, Hetsko ML, Gillin FD (1993) Antigenic switching of TSA 417, a trophozoite variable surface protein, following completion of the life cycle of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 12:5394–5397
- Morgan UM, Reynoldson JA, Thompson RC (1993) Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia spp.* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 37:328–331
- Olson ME, Moreck ME, Ceri H (1996) The efficacy of a *Giardia lamblia* vaccine in kittens. *Can J Vet Res* 60:249–256
- Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E, Svärd S (2005) Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 141:199–207
- Reiner DS, Hetsko ML, Gillin FD (1995) A lipoprotein-cholesterol-albumin serum substitute stimulates *Giardia lamblia* encystation vesicle formation. *J Eukaryot Microbiol* 42:622–627
- Reiner DS, McCaffery JM, Gillin FD (2001) Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cell Microbiol* 3:459–472
- Reiner DS, Hetsko ML, Meszaros JG, Sun CH, Morrison HG, Brunton LL, Gillin FD (2003) Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 278:2533–2540
- Reynoldson JA, Thompson RC, Meloni BP (1991) In vivo efficacy of albendazole against *Giardia duodenalis* in mice. *Parasitol Res* 77:325–328
- Teixeira JC, Heller L, Barreto ML (2007) *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. *Cad Saude Publica* 23:1489–1493
- Touz MC, Rópolo AS, Rivero MR, Vranich CV, Conrad JT, Svärd SG, Nash TE (2008) Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci* 121:2930–2938
- Upcroft P, Upcroft JA (2001) Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev* 14:150–164
- Vesey CJ, Peterson WL (1999) Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:843–850

6.2 Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia* (Artigo publicado)

[Parasitology International 60 \(2011\) 54–58](#)



Contents lists available at [ScienceDirect](#)



Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*

Moema A. Hausen ^a, Rubem F.S. Menna-Barreto ^b, Dalvaci C. Lira ^a, Laís de Carvalho ^c, Helene S. Barbosa ^d

- a. Laboratório de Microscopia e Processamento de Imagens, Depto. de Histologia e Embriologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-170, Brazil
- b. Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 21040-361, Brazil
- c. Laboratório de Cultura de Células, Depto. de Histologia e Embriologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-170, Brazil
- d. Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 21040-361, Brazil

Article history:

Received 2 May 2010

Received in revised form 15 September 2010 Accepted 5 October 2010 Available online 12 October 2010

Keywords:

Giardia lamblia
Metronidazole
Pyrantel pamoate
Synergic effect

Corresponding author. Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 2598 4441; fax: +55 21 2260 4434. E-mail address: helene@ioc.fiocruz.br (H.S. Barbosa). 1383-5769/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. doi: [10.1016/j.parint.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.003)

a b s t r a c t

Giardia lamblia is a pathogenic protozoan presenting as the main characteristic, the trophozoite capacity to adhere in host intestinal epithelium, infecting mammals, including humans. The clinical treatment of this disease is based on metronidazole (Mz) that acts as an alternative electron acceptor, and its reduction promotes DNA impairment. In veterinary treatment, one of the best options is pyrantel pamoate (Pm), which the mode of action has not elucidated yet. Different strategies for *Giardia* treatment have been explored to avoid side effects to the host. In this context, the efficiency of treatment combining drugs raise as an interesting alternative for protozoan diseases. Here, we evaluated in vitro synergic effect of Mz and Pm on trophozoites and on its adherence to IEC-6 cells. The treatment with Mz or Pm was effective on trophozoites, with $IC_{50}/24\text{ h}$ values of $5.3 \pm 0.9\text{ }\mu\text{M}$ and $13.8 \pm 1.4\text{ }\mu\text{M}$, respectively. The treatment of trophozoites with different combinations of Mz and Pm were also evaluated, as showed by fractional inhibitory concentration index (FICI) under 0.5 in all conditions tested, corresponding to the synergic effect. This synergic activity was also observed when the combinations of $5.3\text{ }\mu\text{M}$ Mz + $0.4\text{ }\mu\text{M}$ Pm and $13.8\text{ }\mu\text{M}$ Pm + $0.1\text{ }\mu\text{M}$ Mz induced a remarkable reduction in % adhesion (85–90% and 52–59%, respectively) and in number of adhered parasites per 100 cells. The low cytotoxicity to the host cells of the combinations, associated to the strong synergic potential of the combination, encourage us to further investigate its effect in in vivo models.

1. Introduction

Giardia spp. is a pathogenic protozoan considered the earliest branching eukaryote, presenting as the main characteristic, the capacity of trophozoite form to adhere in host intestinal epithelium [1,2]. *Giardia lamblia* infects different mammals including dogs, cats and humans, and the same strain can be responsible for the disease in domestic animals and humans [3]. The drugs susceptibility of these intestinal protozoa is common related to compounds previously tested on helminths. Despite the evolutionary distance between these organisms and *Giardia* sp., it was already reported that the most of those drugs share similar mechanisms of action and cellular targets such as anaerobic pathways and the microtubules organization in both organisms [4–6].

The current treatment of *G. lamblia* infection is based on metronidazole (Mz), a cytotoxic nitroimidazole that induces to several uncomfortable adverse effects such as headache, gastrointestinal tract disorders and hypersensitivity reactions, accordingly to the U.S. National Institutes of Health. This compound is also employed for radiosensitisation of hypoxic tumours, being included as a potential human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [6–8]. In *Giardia* sp., Mz acts as an alternative electron acceptor, and its reduction in the anaerobic metabolism, promotes DNA damage, blocking its segregation and the parasite division [9]. Morphological alterations were previously characterized on trophozoites treated with Mz such as bubble-like structures [10]. In veterinary treatment, the main options are the praziquantel and pyrantel pamoate (Pm), which are usually prescribed alone or combined [11]. The mode of action of Pm in *G. lamblia* has not elucidated yet, but the involvement of cholinesterases was described in helminths nervous system [12]. Ultrastructural studies showed that Pm induced a disorganization of protozoan lateral flange and an inhibition of the attachment and growth of trophozoites in vitro [13].

Extensive efforts are being directed to the development of different strategies for *Giardia* treatment, avoiding side effects to the host tissues and organs. The increase in the resistance of the parasite to the clinical compounds, together with the recognizable efficiency of combined treatment on many helminths, supports the employment of the combined treatment for protozoa diseases as an interesting alternative. It was also described that drugs combinations potentialize the effect of the compounds alone, therefore outcoming in more effective treatment in a variety of parasitic protozoa such as *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi* [14,15]. In *Entamoeba histolytica*, the combinations of Mz and lactoferrin derivatives induced a higher effect when compared to the drugs alone [16]. In this work, we evaluated the synergic activity of Mz and Pm on *G. lamblia* trophozoite and on its adherence to intestinal

2. Materials and methods

2.1. Parasites and cell cultures

Experiments were performed with trophozoites of *G. lamblia* (WB strain, ATCC 30957) which were grown up to log phase in TYI-S-33 medium (pH 7.0) at 37 °C for 72 h, supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.1 mg/mL of bovine bile, without added vitamins and antibiotics [17].

Monolayers of rat intestinal epithelial cells (IEC-6 line, ATCC CRL-1592) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) added to 10% fetal bovine serum and 1 U/mL of regular human insulin. For all experiments IEC-6 cells were trypsinized, added to 24-well and 96-well plates (Nunc Inc., USA) at final concentrations of 1×10^5 cells/mL and $0,8 \times 10^4$ cells/mL, respectively, and maintained at 37 °C for 24 h in 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Direct effect on *G. lamblia*

G. lamblia trophozoites (2×10^5 parasites/mL) were resuspended in TYI-S-33 medium containing desired final concentrations of Mz and Pm (Sigma-Aldrich, USA) for 24 h at 37 °C. Cell counts were performed in Neubauer chamber and the activity of the compounds and their combinations was expressed as IC₅₀, corresponding to the concentration that leads to 50% parasite lysis. The stock solutions of Mz and Pm were prepared in dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich, USA) at the concentration of 60 mM and 20 mM, respectively.

For the determination of the synergic effect, parasites suspension was incubated with different combinations of Mz and Pm for 24 h in prior to define the optimal and sub-optimal concentrations of each compound. Fractional inhibitory concentration index (FICI) values were calculated by the equation $FICI = IC_{50} \text{ (optimal dose of Mz + sub-optimal dose of Pm)} / IC_{50} \text{ (Mz alone)} + IC_{50} \text{ (optimal dose of Pm + sub-optimal dose of Mz)} / IC_{50} \text{ (Pm alone)}$ [18]. Classical isobolograms were constructed by plotting drugs concentrations (alone and

in combination) that inhibits 50% trophozoites growth. According to accepted guidelines: $FICI \leq 0.5$, synergic effect; $0.5 < FICI \leq 4.0$, no interaction; and $FICI > 4.0$, antagonic effect [19].

The IEC-6 cells achieved monolayers were washed and incubated with *G. lamblia* trophozoites (ratio 2:1 parasite/host cell) for 1 h at 37 °C in the interaction medium that consists in DMEM (pH 7.4), 20% foetal bovine serum, 0.95% trypticase peptone of casein (BBL Microbiology Systems, USA), 0.07% L-cystein (Sigma-Aldrich, USA) and 1 U/mL insulin [20]. After the removal of non-adhered parasites by washing, Mz, Pm and their combinations were added to the infected cultures for 24 h and the percentage of adhesion and the number of adhered parasites/100 cells were quantified using a Zeiss Axiophot microscope (Oberkochen, Germany).

2.3. Toxicity to mammalian cells

Non-infected IEC-6 cells cultured on 96-well plates (Nunc Inc., USA) were treated with the two drugs and their respective combinations for 24 h and their toxicity was evaluated by a dye-reduction assay [21]. The cells were incubated with 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) for 4 h at 37 °C, then DMSO was added to stop the reaction and the absorbance was read at 490 nm in Molecular Devices VersaMax microplate reader (Sunnyvale, USA).

2.4. Statistical analysis

The comparison between control and treated groups was performed by the Mann–Whitney test. Differences with $p \leq 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

The treatment with Mz or Pm was effective on trophozoites in vitro, with $IC_{50}/24$ h values of 5.3 ± 0.9 μ M and 13.8 ± 1.4 μ M, respectively (Fig. 1a,b). An increased activity was observed in parasites treated with different sub-optimal doses of Mz + 13.8 μ M Pm in relation to the treatment with each compound alone, leading to the inhibition up to 66% (Fig. 1c). The combinations of 5.3 μ M Mz + sub-optimal doses of Pm showed no significant increase effect in comparison to each $IC_{50}/24$ h drug alone (Fig. 1c).

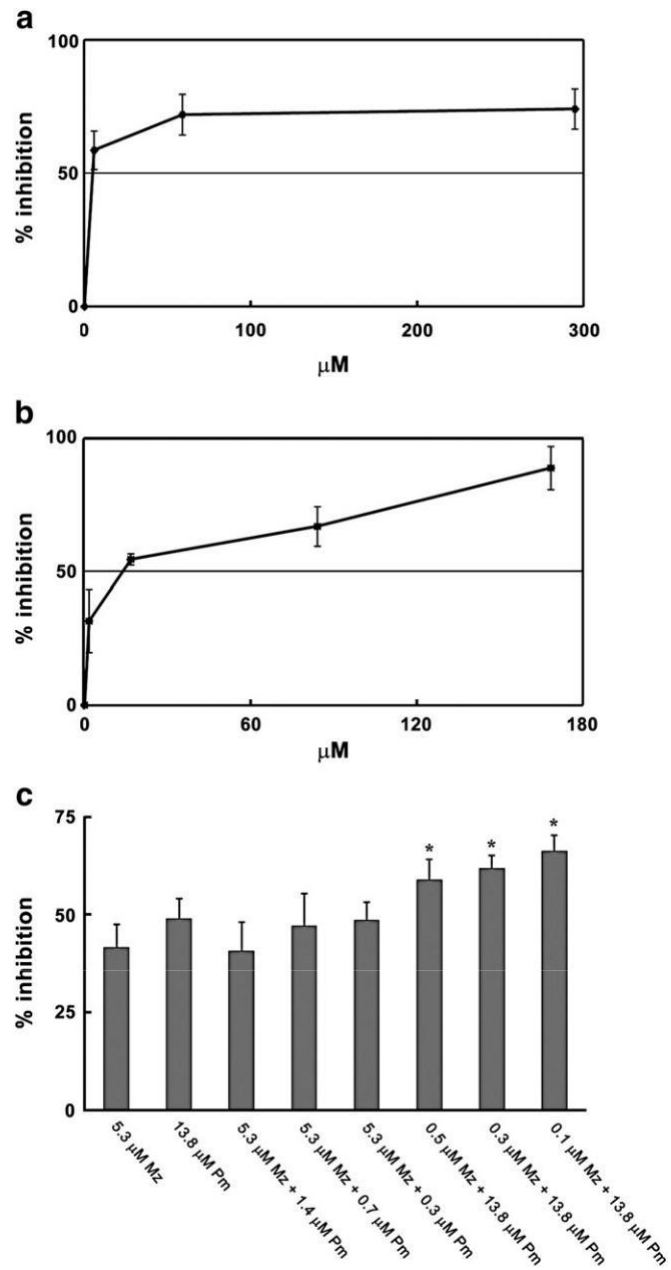
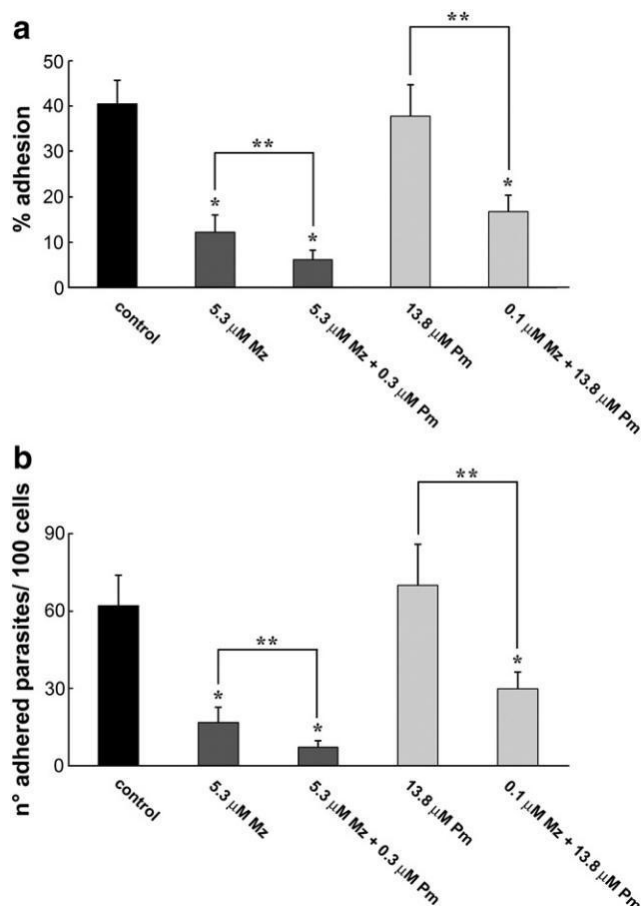


Fig. 1. Effect of (a) Mz, (b) Pm and (c) their combinations on *G. lamblia* trophozoites in TYI-S-33 medium at 37 °C for 24 h. The asterisks indicate significant differences in relation to 5.3 μM Mz and 13.8 μM Pm groups ($p \leq 0.05$).



In prior to analyze the synergic effect of Mz and Pm on trophozoites, different combinations were employed to construct isobolograms: 5.3 μ M Mz+1.4 μ M Pm and 0.5 μ M Mz + 13.8 μ M Pm; 5.3 μ M Mz+0.7 μ M Pm and 0.3 μ M Mz+13.8 μ M Pm; and 5.3 μ M Mz+0.4 μ M Pm and 0.1 μ M Mz+13.8 μ M Pm, being FICI=0.31 $\pm$ 0.02, 0.15 $\pm$ 0.03 and 0.07 $\pm$ 0.01, respectively ([Table 1](#)). As described above, FICI values under 0.5, correspond a synergic activity, and all the combinations tested are in this range. It was also observed that the strongest synergic effect at combinations containing lower sub-optimal doses of both compounds ([Table 1](#)).

Another set of experiments was performed to evaluate the effect of Mz, Pm and their combinations on the interaction of trophozoites and IEC-6 cells. Based on the IC₅₀/24 h values for the axenic parasites, it was observed that 5.3 μ M Mz led to an important decrease in % adhesion of trophozoites on cell surface ([Fig. 2a](#)) and in the number of adhered parasites per 100 cells ([Fig. 2b](#)), inhibiting 70% of adhesion in both parameters while 13.8 μ M Pm not presented a significant difference in relation to control ([Fig. 2a,b](#)). The combinations of 5.3 μ M Mz +0.4 μ M Pm and 13.8 μ M Pm+0.1 μ M Mz also induced a remarkable reduction in % adhesion and number of adhered parasites per 100 cells, being the % inhibition in range of 85–90% and 52–59%, respectively. MTT assays carried out with non-infected IEC-6 cells showed that the preservation of Mz-treated cells viability up to 84.8 μ M, however high doses of Pm (220.8 μ M) led to lysis of 50% cells. It was also observed that the combinations presented the same viability of untreated cells, except to a strong combination of 5.3 μ M Mz +138 μ M Pm which the toxicity was similar to the higher dose of Pm alone ([Table 2](#)).

4. Discussion

Many efforts have been made for substitute the current treatment of *Giardia* infection, due to the increasing number of refractory cases after use of nitroimidazoles or other chemotherapeutic agents (i.e. praziquantel, benzimidazoles and pamoate salts). In order to improve the efficacy and reduce treatment course, drug combinations have been explored for different bacterial, viral and parasitic infections [22]. On axenic trophozoites, Mz presented a higher activity ($IC_{50}/24\text{ h}=5.3\pm0.9\text{ }\mu\text{M}$) in relation to Pm ($IC_{50}/24\text{ h}=13.8\pm1.4\text{ }\mu\text{M}$), being similar to $IC_{50}/24\text{ h}$ values of Mz and Pm obtained for other *G. lamblia* strains and isolates [10,13,23,24]. Recently, structural modifications in Mz molecule were made, and four analogues presented higher giardicidal activity in comparison to Mz, without relevant cytotoxic effects to the host cells [25]. The employment of Mz analogues alone or in combination with other drugs such as Pm, could represent an interesting opportunity to increase even more the anti-giardia potential.

The combination of different concentrations of Mz and Pm showed that sub-optimal doses of Mz +13.8 μM Pm led to an increase in the inhibition of the parasite proliferation. It suggests a potencialization of the compounds effect, as already described for *P. falciparum* and *T. cruzi* treated with clotrimazole+amphotericin B and mevinolin+ergosterol biosynthesis inhibitors, respectively [14,26]. Isobolograms analysis in the present study indicated a synergic activity in all experimental conditions performed in the *Giardia* sp. model employing Mz and Pm. A dose-dependent decrease in FICI values, points to the higher synergy in

Table 1

Synergic effect of Mz and Pm on *G. lamblia* trophozoites.

Drugs combinations ^a	[CI] ^b	ctivity ^c
50Mz + 10% IC_{50} Pm and 10% IC_{50} Mz + IC_{50} Pm	31 ± 0.02^d	
50Mz + 5% IC_{50} Pm and 5% IC_{50} Mz + IC_{50} Pm	15 ± 0.03	
50Mz + 2% IC_{50} Pm and 2% IC_{50} Mz + IC_{50} Pm	07 ± 0.01	

- IC_{50} drug “A” + sub-optimal dose drug “B” and sub-optimal dose drug “A” + IC_{50} drug “B.”
- Fractional inhibitory concentration index.
- S, synergic effect; NI, no interaction; A, antagonic effect.
- Mean $\pm$ standard deviation for 4 independent experiments.

Fig. 2. Effect of Mz, Pm and their combinations on the attachment of *G. lamblia* trophozoites on IEC-6 cells. (a) The percent of adhesion and (b) the number of adhered parasites per 100 cells. The treatment with the combinations led to the increase in the inhibition in relation to Mz and Pm alone. One asterisk represents the

significant difference in relation to control ($p \leq 0.02$), and two asterisks indicate differences in comparison to 5.3 μM Mz and 13.8 μM Pm groups ($p \leq 0.05$).

combinations of 5.3 μM Mz+0.3 μM Pm and 0.1 μM Mz+13.8 μM Pm on trophozoites, open promising possibilities of doses reduction during the giardiasis treatment, maintaining similar proliferation inhibition. The synergic effect of drugs on *G. lamblia* was already reported for phenyl-carbamate derivatives and albendazole, being suggested the further potential application in the giardiasis therapy [27]. Previous studies pointed to potent in vivo synergic effect of miltefosine+amphotericin B and mevinolin+ketoconazole on *Leishmania* sp. and *T. cruzi*, respectively [22,26]. The treatment of experimental *Giardia* sp. infected kittens with combinations of febantel, pyrantel and praziquantel demonstrated potential results, increasing the percentage of apparent cure [11]. Therefore, our in vitro results motivate the investigation of the combined treatment of Mz and Pm in murine models.

Table 2

Cytotoxic effect of Mz, Pm and their combinations on IEC-6 cells.

Drugs combinations	
.3 μM Mz	
84.8 μM Mz	92.4 $\pm$ 6.8
13.8 μM Pm	83.1 $\pm$ 12.9
220.8 μM Pm	43.1 $\pm$ 7.1
.1 μM Mz + 13.8 μM Pm	86.0 $\pm$ 9.5
.3 μM Mz + 0.3 μM Pm	98.1 $\pm$ 5.0
.3 μM Mz + 13.8 μM Pm	85.8 $\pm$ 10.1
53 μM Mz + 13.8 μM Pm	81.1 $\pm$ 9.5
.3 μM Mz + 138 μM Pm	49.9 $\pm$ 2.6

a. Mean $\pm$ standard deviation for 4 independent experiments.

The combined treatment also interferes with % adhesion of parasites in the intestinal epithelial cells. The combination of 0.1 μM Mz + 13.8 μM Pm presented the highest synergic activity on axenic trophozoites, and also induced an important reduction in the % adhesion (about 80%). However, the highest inhibition of the attachment of *G. lamblia* on IEC-6 cells was determined after the treatment with 5.3 μM Mz + 0.3 μM Pm (in range of 90%). Previous studies with thiazolide showed a significant inhibitory effect on the adherence of the parasite in Caco-2 cultures, despite the moderate inhibition of *G. lamblia* proliferation in axenic condition [23]. In the present work, the intense synergic effect of Mz and Pm was observed on both experimental situations, pointing to the effect of the combinations on free and adhered parasites. Our data also demonstrated the damage

to the host cells detected only in combined concentrations at least 10-fold higher than those doses employed to reduce the infection, an important indicative of low cytotoxicity, as already reported for IEC-6 cell line treated with natural products [28].

Pm belongs to the tetrahydropyrimidine family which mode of action involves different metabolic changes in the oxidative path-ways, however in *Giardia* sp. and other anaerobic pathogens the mechanism is unclear. Previous pharmacokinetic studies reported a significant absorption of Pm in large intestine of pigs, decreasing the compound bioavailability in the infection site [29]. So far, the Pm incorporation by IEC-6 cells could explain the more prominent effect on the trophozoites adhesion of high concentration of Mz + sub-optimal doses of Pm. On the other hand, Mz degradation rate is constant in different experimental conditions such as buffer and pH variation [30]. Furthermore, it was demonstrated that intestinal epithelia of *G. lamblia* cronically infected animals secrete high rate of anions, mainly chloride salts [31]. So far, this active anion secretion was observed in other infections such as in HIV, resulting in the cytokines release from sub-epithelial immune cells [32]. For the effective removal of *G. lamblia*, it is well-described that mechanisms of host defense have to be activated in the intestinal lumen. Several components of the natural immune system, such as defensins and lactoferrin, possibly contribute in this process [33,34]. One of those strategies involves nitric oxide (NO) production by the intestinal epithelium. In order to evade the immune system, *G. lamblia* consumes arginine, the crucial substrate used by epithelial NO synthase to form NO [35]. Our hypothesis involves that the treatment with Mz + Pm could exacerbate a potent host defense, preventing the protozoan to escape. These secreted salts, cytokines and/or other molecules produced by IEC-6 cells could have an additional activity to the effect of the combined drugs. Studies performed with Caco-2 cells raise the possibility of an additional intestinal component provided by these intestinal cells could modulate the action of the drugs [23]. Complementary assays must be performed to answer these important questions.

Our light microscopy data showed that the treatment induced an accentuated decrease in % adhesion of parasites to IEC-6 cells but no morphological injury in host cells in any drug combination performed was observed. Potent cytoskeleton inhibitors (cytochalasin, colchicine and nocodazole) induced a completely misshapen, detachment from the parasite substract, cell division impairment and alterations in flagella number [38,39]. One possibility for this interference is that Mz and Pm interfered in the ventral disk functionality, as described for anti-cytoskeleton agents. This structure is a crucial in trophozoite cell biology, involved in the nutrients uptake, besides the attachment of the parasite to host cell [38,40]. The combined treatment of Mz and Pm could induce alterations in this structure, reducing the % adhesion and also leading to the trophozoites death, as demonstrated for thiazolides-treated parasites [23]. Flagellar and body damages were observed in trophozoites under treatment with other classes of drugs [23,36,37]. Our preliminary results indicate similar alterations in trophozoites treated with both combina-tions tested (0.1 μ M Mz +13.8 μ M Pm and 5.3 μ M Mz+ 0.3 μ M Pm) (data not shown). Interestingly, neither of its morphological alterations were previously observed in parasites treated with Mz or Pm alone [10,13], suggesting a specific mode of action of the combination of both compounds.

Giardiasis still poses critical challenges, including an efficient chemotherapy. The current severe side effects and questionable activity in chronic phase and an increased resistance are the main difficulties in the clinical administration of Mz [41]. Clinically, Pm is usually administrated in combination with other anti-helminthic drugs, and presented absence, or mild side effects for dogs and humans [42,43]. The strong activity of the combined treatment of Mz and Pm, increasing the inhibition of trophozoites proliferation and its attachment on the IEC-6 cultures, associated to the high preservation of the host cells morphology and metabolic viability, points to the combination of these two compounds, as an excellent alternative for the treatment assays of *Giardia* infection in vivo.

Acknowledgments

This work is dedicated to the memory of Professor Luiz Henrique Monteiro-Leal. The authors thank Dr. José Morgado-Díaz, Dra. Ana Paula R. Gadelha and Júlio Cesar M. Freitas-Jr for the critical discussion about trophozoites and host cell interaction, and to the financial support in the form of grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

References

1. Balázs M, Szatlóczky E. Electron microscopic examination of the mucosa of the small intestine in infection due to *Giardia lamblia*. *Pathol Res Pract* 1978;163: 251–60.
2. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:447–75.
3. Rosa LA, Gomes MA, Mundim AV, Mundim MJ, Pozzer EL, Faria ES, et al. Infection of dogs by experimental inoculation with human isolates of *Giardia duodenalis*: clinical and laboratory manifestations. *Vet Parasitol* 2007;145:37–44.
4. Docampo R, Moreno SN. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proc* 1986;45:2471–6.
5. Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 1997;154:5–7.
6. Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JA. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2003;2:529–41.
7. Edwards DI. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Br J Vener Dis* 1980;56:285–90.
8. Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and pharmaco-dynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet* 1999;36: 353–73.
9. Harris JC, Plummer S, Lloyd D. Anti-giardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;57:614–9.
10. Campanati L, Monteiro-Leal LH. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitol Res* 2002;88:80–5.
11. Scorza AV, Radecki SV, Lappin MR. Efficacy of a combination of febantel, pyrantel, and praziquantel for the treatment of kittens experimentally infected with *Giardia* species. *J Feline Med Surg* 2006;8:7–13.
12. Feng-lin W, Kai-pi N, Chu-ying W. The activity of cholinesterase in human hookworms following expelling of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus*. *Chin Med J Engl* 1979;92:41–4.
13. Campanati L, Gadelha AP, Monteiro-Leal LH. Electron and video-light microscopy analysis of the in vitro effects of pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol* 2001;97:9–14.
14. Bhattacharya A, Mishra LC, Bhasin VK. In vitro activity of artemisinin in combination with clotrimazole or heat-treated amphotericin B against *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:721–8.
15. Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:780–4.

16. León-Sicaire N, Reyes-López M, Ordaz-Pichardo C, de la Garza M. Microbicidal action of lactoferrin and lactoferricin and their synergistic effect with metronidazole in *Entamoeba histolytica*. *Biochem Cell Biol* 2006;84:327–36.
17. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:487–8.
18. Hallander HO, Dornbush K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporin with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:743–52.
19. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:1.
20. Gadelha AP, Travassos R, Monteiro-Leal LH. The evaluation of a semiautomated computer method to determine the effects of DMSO on *Giardia lamblia*–intestinal cell interaction. *Parasitol Res* 2007;101:1401–6.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55–63.
22. Seifert K, Croft SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:73–9.
23. Müller J, Rühle G, Müller N, Rossignol JF, Hemphill A. In vitro effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:162–70.
24. Cruz A, Sousa MI, Azeredo Z, Leite E, Figueiredo de Sousa JC, Cabral M. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1017–20.
25. Busatti HG, Vieira AE, Viana JC, Silva HE, Souza-Fagundes EM, Martins-Filho OA, et al. Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. *Parasitol Res* 2007;102:145–9.
26. Urbina JA, Lazardi K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, et al. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:580–91.
27. Jiménez-Cardoso E, Flores-Luna A, Pérez-Urizar J. In vitro activity of two phenyl-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazole against albendazole-resistant *Giardia intestinalis*. *Acta Trop* 2004;92:237–44.
28. Vidal F, Vidal JC, Gadelha AP, Lopes CS, Coelho MG, Monteiro-Leal LH. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol* 2007;115:25–31.
29. Bjørn H, Hennessy DR, Friis C. The kinetic disposition of pyrantel citrate and pamoate and their efficacy against pyrantel-resistant *Oesophagostomum dentatum* in pigs. *Int J Parasitol* 1996;26:1375–80.
30. Wang DP, Yeh MK. Degradation kinetics of metronidazole in solution. *J Pharm Sci* 1993;82:95–8.
31. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 2007;56:328–35.
32. Schmitz H, Rokos K, Florian P, Gitter AH, Fromm M, Scholz P, et al. Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *AIDS* 2002;16:983–91.
33. Turchany JM, Aley SB, Gillin FD. Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infect Immun* 1995;63:4550.
34. Clark IA, Rockett KA. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol* 1996;37:1.
35. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, et al. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol* 2000;164:1478–87.
36. Pérez-Arriaga L, Mendoza-Magaña ML, Cortés-Zárate R, Corona-Rivera A, Bobadilla-Morales L, Troyo-Sanromán R, et al. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Trop* 2006;98:152–61.
37. Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Anislado-Tolentino V, Martínez-Gordillo MN. *Oregano* (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitol Res* 2006;98:557–60.
38. Mariante RM, Vancini RG, Melo AL, Benchimol M. *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Exp Parasitol* 2005;110:62–72.
39. Corrêa G, Benchimol M. *Giardia lamblia* behavior under cytochalasins treatment. *Parasitol Res* 2006;98:250–6.
40. McCabe RE, Yu GSM, Contreas C, Morrill PR, McMorro B. In vitro model of attachment of *Giardia intestinalis* trophozoites to IEC-6 cells, an intestinal cell line. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:29–35.
41. Müller J, Sterk M, Hemphill A, Müller N. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:280–7.

42. Desowitz RS, Bell T, Williams J, Cardines R, Tamarua M. Anthelmintic activity of pyrantel pamoate. *Am J Trop Med Hyg* 1970;19:775–8.
43. Barr SC, Bowman DD, Frongillo MF, Joseph SL. Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate, and febantel against giardiasis in dogs. *Am J Vet Res* 1998;59:1134–6.

7 DISCUSSÃO

7.1 Discussão referente ao primeiro artigo publicado

Dentre os quatro benzimidazóis testados (AB, MB, TB e MB), o AB mostrou ser o mais efetivo na inibição dos processos de encistamento e desencistamento de *Giardia*, e por isso, foi a droga escolhida para a análise morfológica do seu efeito sobre o parasito.

Durante o processo de encistamento foi demonstrado que a célula desmonta o disco adesivo em quatro partes distintas, dispostas aos pares próximas a cada par de núcleos (Palm *et al*, 2005). Nossos resultados demonstraram que, com AB os microtúbulos agregados se dissociaram do disco adesivo e se dispersaram no citoplasma, de maneira completamente aleatória, desfazendo-se do padrão descrito por Palm e colaboradores (2005). A desagregação do disco adesivo foi descrita em trofozoítos sob o efeito de AB (Chávez *et al*, 1992) e sob efeito de nocodazol (Mariante *et al*, 2005). Intrigantemente, nossos resultados mostraram cistos maduros e aparentemente viáveis, apresentando completa perda da organização do disco adesivo (vide figura 4, do artigo), sugerindo que as células que resistiram à droga e chegaram à forma cística levaram a alteração defeituosa até a fase madura do cisto.

O termo resistência é normalmente empregado quando o organismo desenvolve qualquer via metabólica ou estrutural para evitar os efeitos deletérios de uma droga, o que também depende de fatores de virulência (Upcroft & Upcroft, 2001). Uma vez que a diferenciação celular é uma fase crítica para a *Giardia*, foi considerado neste trabalho que esta capacidade para alcançar a forma cística mesmo sob o efeito das drogas, poderia ser um modo de resistir e se adaptar, permitindo que ocorra o encistamento e não a sua morte. Essa adaptação, demonstrada a partir da mesma taxa inibitória, conforme apresentado na Tabela I, em todas as concentrações de AB, foi comparada com os valores de IC₅₀ de AB em trofozoítos estudados previamente (Cedillo-Rivera & Muñoz, 1992; Cruz *et al*, 2003). Foi verificado que para se obter uma IC₅₀ para inibir o encistamento a concentração da droga necessária iria, provavelmente, matar a grande maioria de trofozoítos nos períodos iniciais do encistamento. Trofozoítos encistando apresentam suas vias exo e endocíticas completamente modificadas, i.e., quando as vias de produção das proteínas da parede cística são ativadas o transporte de algumas moléculas diminui, como por exemplo na glicose (Reiner *et al*, 2001;

Gottig *et al*, 2006; Touz *et al*, 2008). Esta condição explicaria a baixa atividade do AB na formação do cisto.

A hipótese de resistência também é reforçada quando comparamos a inibição do encistamento com as alterações morfológicas encontradas. Embora as crescentes concentrações de AB tenham gerado a mesma porcentagem de cistos, o número de degenerações na morfologia aumentou progressivamente de acordo com a dose, apesar de alta inibição do encistamento, quando comparado com os demais benzimidazóis testados, a habilidade de sintetizar e liberar os componentes da parede cística não foram perdidas durante os efeitos de AB que não atingiram a forma cística madura (Fig. 2c-d).

Na figura 4F os microtúbulos foram observados desagregados ao redor de um material amorfo e pouco eletrondenso. Especulamos que a natureza deste material seja tubulina despolimerizada, sendo foco posterior de análise para imunomarcagem de proteínas do citoesqueleto. A dispersão gradual dos microtúbulos, dependente da concentração usada, provavelmente explica a baixa taxa de eficiência nos procedimentos de desencistamento.

Um estudo semelhante foi realizado em cistos maduros obtidos a partir de fezes humanas (Bernal-Redondo *et al*, 2004), os cistos foram expostos ao AB e então levados ao desencistamento sem droga. Os autores deste trabalho não observaram nenhuma alteração nos cistos tratados com AB. Baseado nos seus conhecidos efeitos sobre trofozoítos de *Giardia* e nos dados de Bernal-Redondo e colaboradores (2004), sugerimos que os efeitos de AB descritos neste trabalho possam estar restritos ao processo de encistamento quando a célula ainda é metabolicamente ativa e ainda não desenvolveu completamente sua parede cística. A ausência dos efeitos de AB, conforme observada por Bernal-Redondo e colaboradores (2004), poderia ser provavelmente devida à baixa penetração da droga pela parede cística ou, até mesmo, pela baixíssima taxa metabólica na qual se encontra a *Giardia* na forma de cisto, e com isso apresentando uma baixa ou nenhuma absorção da droga. A análise do desencistamento dos cistos maduros tratados com AB não mostrou uma taxa satisfatória, caindo a zero o percentual de células desencistadas. Este mesmo percentual também foi alcançado por Bernal-Redondo e colaboradores (2004), mas, utilizando uma outra fonte de obtenção de cistos. Nossos resultados mostram que durante o desencistamento de *Giardia* o AB apresentou o percentual zero em uma concentração 10x menor do que o encontrado por estes autores.

As observações por vídeo-microscopia de células encistando em meio de encistamento contendo AB mostraram que, a maioria das células apresentou as típicas estruturas observadas durante o processo de encistamento, como previamente descrito e recentemente revisto

(Upcroft & Upcroft, 2001). Curiosamente, depois do período de encistamento, o número de cistos diminuiu quando comparado com o controle, porém, foi observado um ligeiro aumento no número de cistos inviáveis. Muitos dos trofozoítos que não encistaram apresentaram características intermediárias entre cistos e trofozoítos, tais como: forma arredondada, vesículas secretórias de encistamento, birefringência periférica e flagelos perdendo a motilidade.

O citoesqueleto é essencial para a diferenciação, e é predominantemente formado por estruturas microtubulares (Campanati *et al*, 2003). O AB é um benzimidazole carbamato que afeta o citoesqueleto de *Giardia* (Hall & Nahar 1993; Cruz *et al*, 2003). Foi mostrado que em protozoários os derivados de benzimidazóis se ligam a heterodímeros de α , β -tubulina dos microtúbulos em formação, levando à polimerização, e quando se liga a microtúbulos já formados leva à despolimerização (MacDonald *et al*, 2004). O AB se liga à unidade β -tubulina, afetando a polimerização dos microtúbulos nos trofozoítos (Edlind *et al*, 1990). Durante o encistamento de *Giardia* não há montagem dos microtúbulos, mas, e sim desmonte do citoesqueleto, principalmente no disco adesivo, enquanto no desencistamento uma rápida montagem desta estrutura é seguida pela citocinese (Palm *et al*, 2005). Consequentemente, nós sugerimos que o AB se ligou à tubulina dos cistos e interferiu fortemente no desencistamento (0% de eficiência), todavia não interferiu tanto no processo de desencistamento (33% de inibição da diferenciação). Com base na ação benzimidazóis descrita na literatura e nos resultados aqui apresentados, isso provavelmente explica porque o encistamento foi menos inibido do que o desencistamento.

Estudos clínicos já sugeriram o AB sozinho ou junto com mebendazol ou metronidazol para tratamento da giardíase (Reynoldson *et al*, 1992; Cedillo-Rivera e Muñoz, 1992). Além disso, menos de 25 cistos ingeridos são suficientes para causar uma infecção (Vesý & Peterson 1999). De acordo com esses autores, mais importante do que o tratamento é a prevenção, mas, quando o paciente está infectado por *Giardia*, metronidazol (Flagyl®; Sanofi Aventis S/A), a furazolidona (Giarlam®; Uci Pharma S/A) ou o albendazol (Zentel®; GlaxoSmithKline S/A) ainda são as principais drogas prescritas.

Há pouca informação na literatura sobre quão infectantes são os cistos que são liberados pelos pacientes durante o tratamento. Neste trabalho, propomos que as drogas empregadas contra *Giardia*, além de serem efetivas em trofozoítos, também atuem na diferenciação de giárdia. É claro, como aqui demonstrado, que nenhum dos benzimidazóis testados é tão eficiente quanto sobre trofozoítos e esta condição deveria ser levada em consideração durante o tratamento. Isto incluiria a análise de um tratamento seguro tanto para

o paciente quanto para o ambiente do qual são eliminados os cistos, principalmente se as condições sanitárias locais não são ideais. Nosso trabalho com o AB, a droga mais efetiva contra *Giardia*, como previamente descrito, abre novas perspectivas de estudo no que se refere à diferenciação de *Giardia*: (1) como o AB afeta a diferenciação; (2) o estabelecimento de um novo modelo de avaliação dos efeitos de drogas na biologia celular de *Giardia*: seu processo de diferenciação. Baseado nos dados já publicados e em nossos resultados, a avaliação dos efeitos dos benzimidazóis sobre a diferenciação de *Giardia* contribui para o estudo da biologia celular deste parasito, com a abordagem específica para o efeito de droga na fase crítica de seu ciclo de vida, demonstrando assim a interferência na formação do citoesqueleto do cisto.

7.2 Discussão referente ao segundo artigo publicado

O tratamento habitual de *Giardia* no Brasil ainda é à base de metronidazol em humanos, e apresenta muitos casos de fortes efeitos colaterais e alguns de resistência à droga, levando a reincidência. No tratamento em animais domésticos, o pamoato de pirantel é a droga mais prescrita (normalmente em associação com praziquantel), e os índices de recorrência são muito maiores.

Com o objetivo de aprimorar a eficácia e reduzir os índices de reincidência, o emprego de drogas combinadas tem sido explorado para tratamentos contra bactérias, vírus e doenças parasitárias (Seifeit & Croft, 2006). Em trofozoítos em cultura, o MZ apresentou uma maior atividade ($IC_{50}/24h = 5,3 \pm 0,9 \mu M$) em comparação com o PM ($IC_{50}/24h = 13.8 \pm 1.4 \mu M$) sendo semelhante a $IC_{50}/24h$ de outras cepas e isolados de *Giardia* obtidos (Campanati *et al*, 2001; Campanati & Monteiro-Leal, 2002; Cruz *et al*, 2003; Müller *et al*, 2006).

Segundo Busatti e colaboradores (2007) modificações estruturais na molécula de MZ mostraram que os quatro análogos gerados deste nitroimidazol apresentaram alta atividade anti-*Giardia* em comparação com o MZ, mas sem os efeitos citotóxicos na célula hospedeira. O uso de análogos de MZ sozinhos ou em combinação com outras drogas, tais como, o PM poderiam representar uma interessante oportunidade para aumentar ainda mais o potencial de ação anti-giárdia destes fármacos.

A combinação de diferentes concentrações de MZ e PM mostraram que as doses sub-ótimas de MZ + $13.8 \mu M$ PM levaram a um aumento na inibição da proliferação do parasito. Isto sugere uma potencialização dos efeitos das drogas, como já descrito, para o protozoário

Plasmodium falciparum e *Trypanosoma cruzi* tratados com os inibidores de biosíntese clotrimazole em conjunto com anfotericina B e mevinolina mais ergosterol, respectivamente (Urbina *et al* 1993; Bahttacharya *et al*, 2008).

A análise com isobologramas indicou atividade sinérgica em todas as condições testadas. Um decréscimo dose-dependente nos valores do FICI aponta para uma maior sinergia em combinações de 5.3 μM MZ + 0,3 μM PM e 0.1 μM MZ + 13.8 μM PM. Estas combinações abrem portas para uma real possibilidade em diminuir a dose e manter o mesmo padrão de inibição da proliferação. O efeito sinérgico das drogas em *G. lamblia* foi previamente demonstrado para fenil-carbamatos mais albendazol, sugerindo uma potente aplicação na terapia com giárdia (Jimenez-Cardoso *et al*, 2004). Estudos anteriores apontaram também efeitos sinérgicos para os protozoários *Leishmania sp.* e *T. cruzi* utilizando miltefosina mais anfotericina B e mevinolina mais cetoconazol, respectivamente (Urbina *et al*, 1993; Seifert *et al*, 2006).

O tratamento de gatos infectados com combinações de febantel, pirantel e praziquantel mostrou resultados potenciais, aumentando a percentagem de cura aparente (Scorza *et al*, 2006). Assim, nossos resultados *in vitro* nos motivam a investigar o tratamento combinado de MZ e PM em camundongos. O tratamento combinado também interfere na porcentagem de adesão dos parasitos às células epiteliais intestinais. A combinação que apresentou a maior atividade sinérgica nos trofozoítos (0,1 μM MZ + 13,8 μM PM) induziu a uma significativa redução no percentual de adesão (cerca de 80%). Entretanto, a maior inibição na adesão dos trofozoítos às IEC-6 foi de 5,3 μM MZ + 0,3 μM PM (cerca de 90%). Müller e colaboradores (2006) mostraram que a tiazolida apresentou efeito inibitório muito significativo na aderência do parasito às células epiteliais (CaCo-2), embora houvesse uma moderada inibição na proliferação de giárdia nas condições axênicas.

No presente trabalho, a intensa atividade sinérgica de MZ e PM foi observada em ambas situações experimentais, demonstrando o efeito das combinações em células aderidas ao vidro e nas aderidas nas IEC-6. Nossos dados também detectaram o dano para a célula hospedeira, apenas nas concentrações combinadas pelo menos 10x maior do que nas doses empregadas para reduzir a infecção, um importante indicativo de baixa toxicidade, como já reportado para as IEC-6 quando tratados com extratos naturais (Vidal *et al*, 2007).

O PM pertence à família das tetraidropirimidinas e seu mecanismo de ação envolve diferentes mudanças metabólicas nas vias oxidativas. Entretanto, o modo como atua em *Giardia sp.* e outros organismos anaeróbicos ainda não está elucidado. Estudos farmacocinéticos demonstraram uma absorção significativa de PM no intestino grosso de

porcos, diminuindo sua biodisponibilidade no sítio de infecção (Bjørn *et al*, 1996). Aparentemente, a incorporação de PM pelas células IEC-6 poderia explicar os efeitos mais fortes na adesão dos trofozoítos em altas concentrações de MZ nas doses sub-ótimas de PM. Por outro lado, a taxa de degradação de MZ é constante em diferentes condições experimentais, tais como, variações no tamponamento e no pH (Wang & Yeh, 1993). Troeger e colaboradores (2007) demonstraram que em animais com infecção crônica de *Giardia* o epitélio intestinal secreta taxas elevadas de ânions, principalmente sais de cloro. Assim, esta secreção aniônica constante foi observada em outras enteropatias, tais como, infecções por HIV, resultando na liberação de citocinas das células do sistema imune de localização subepitelial (Schmitz *et al*, 2002). Outros mecanismos já foram bem descritos e são utilizados na defesa do hospedeiro, na tentativa de remover a infecção por *Giardia*. Diversos componentes intrínsecos do sistema imune, tais como, defensinas e lactoferrinas, possivelmente contribuem nesse processo (Turchany *et al*, 1995; Clark & Rockett, 1996). Uma outra estratégia envolve a produção de óxido nítrico pelas células epiteliais intestinais. A *Giardia*, por sua vez, para burlar essa resposta do sistema imune consome arginina, o principal substrato utilizado pela enzima óxido nítrico sintetase das células epiteliais para converter a arginina em óxido nítrico (Eckmann *et al*, 2000). Uma hipótese para o tratamento com MZ mais PM seria um possível aumento da resposta do hospedeiro, evitando que o protozoário burle a produção de óxido nítrico. Estes sais secretados, citocinas e quaisquer outras moléculas produzidas pelas IEC-6, poderiam ter uma atividade adicional para o efeito combinado de drogas. Müller e colaboradores (2006) também sustentam a possibilidade de que componentes intestinais adicionais provenientes de células CaCo-2, também estejam relacionadas com a modulação da ação de drogas. Ainda assim, ensaios complementares devem ser realizados para confirmar esta importante questão.

A microscopia eletrônica de varredura corrobora os dados de microscopia de luz mostrando que o tratamento induziu a um acentuado decréscimo no percentual de adesão dos parasitos, mas nenhuma alteração morfológica foi observada em nenhuma IEC-6 em quaisquer combinações das drogas empregadas. Trofozoítos tratados com ambas as combinações testadas (0,1µM Mz mais 13,8 µM PM e 5,3 µM MZ mais 0,3 µM PM) apresentaram alterações no corpo e perda dos flagelos. Interessante ressaltar que, nenhuma dessas alterações foi observada em trofozoítos tratados apenas como MZ ou PM sozinhos, em trabalhos anteriores (Campanati *et al*, 2001; Campanati & Monteiro-Leal, 2002) sugerindo um modo de ação específico oriundo da combinação das duas drogas. Efeitos similares nos danos observados nos flagelos e no corpo da *Giardia* foram já observados com outras classes

de drogas (Müller *et al*, 2006; Pérez-Arriaga *et al*, 2006; Ponce-Macotella *et al*, 2006). Potentes inibidores do citoesqueleto (citocalasina, colchicina e nocodazol), induziram a completa perda da forma e adesão do parasito ao substrato, além de danos na divisão celular e alteração no número de flagelos (Mariante *et al*, 2005; Corrêa & Benchimol, 2006). A aparência da região dorsal de parasitos aderidos observados após o tratamento com as combinações, sugere uma diminuição na capacidade de adesão do parasito pelo disco adesivo. Uma possibilidade é que o MZ mais o PM interferiram na funcionalidade do disco adesivo, como já descrito, em drogas que atuam no citoesqueleto. Esta estrutura é importante para a biologia celular do trofozoíto, pois está envolvida no ganho de nutrientes, além da adesão ao parasito (McCabe *et al*, 1991; Mariante *et al*, 2005). O tratamento combinado de MZ e PM poderia induzir a alterações em sua estrutura reduzindo o percentual de adesão e também levando o parasito à morte, como já demonstrado em trofozoítos tratados com tiazolida (Müller *et al*, 2006).

A terapêutica da giardíase ainda é motivo de desafios no que tange a uma quimioterapia eficiente e segura. Os fortes efeitos colaterais e o aumento na resistência do parasito, em resposta ao tratamento, são grandes dificuldades na administração clínica de MZ (Müller *et al*, 2007). Clinicamente, o PM é administrado em combinação com outros anti-helmínticos, juntamente com febantel e praziquantel para uso veterinário (Drontal®, comercializado pela Bayer S/A). A administração de PM sozinho ou concomitante com outras drogas apresenta baixos efeitos colaterais em humanos e cães (Desowitz *et al*, 1970; Barr *et al*, 1998; Bagheri *et al*, 2004). A extensa atividade do tratamento combinado com PM e MZ, potencializando a inibição do crescimento dos trofozoítos e sua adesão as IEC-6, associado à alta preservação da morfologia da célula hospedeira e sua viabilidade metabólica, aponta para uma excelente alternativa, ou seja, a combinação destes dois fármacos para o tratamento da infecção de *Giardia in vivo*.

CONCLUSÕES

O efeito dos benzimidazóis AB, MB, TB e MB sobre o citoesqueleto de *Giardia* contribui para o estudo da sua biologia celular, com a abordagem específica para o efeito de droga na fase crítica de seu ciclo de vida, demonstrando a interferência na formação do citoesqueleto do cisto bloqueando, assim, o ciclo de vida deste parasito.

A extensa atividade sinérgica sobre a morfologia de giárdia durante tratamento combinado de pamoato de pirantel e metronidazol potencializou a inibição do crescimento dos trofozoítos e sua adesão as IEC-6. Além disso, manteve a alta preservação da morfologia da célula hospedeira, mantendo sua atividade celular e despontando como uma excelente alternativa para um possível tratamento clínico após testes em animais.

REFERÊNCIAS

- Abel ES, Davids BJ, Robles LD. Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem 2001; 276:10320-9.
- Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991; 55(4):706-32.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 2001; 14(3):447-75.
- Bagheri H, Simiand E, Montastruc JL, Magnaval JF Bagheri H, Simiand E, Montastruc JL, Magnaval JF Adverse drug reactions to anthelmintics. Ann Pharmacother 2004; 38(3):383-8.
- Barker HA, Smyth RD, Weissbach H, Toohey JJ, Ladd JN, Volcani BE. Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing Benzimidazole or 5,6-Dimethylbenzimidazole. J Biol Chem 1960; 235 (2):480-488
- Barr SC, Bowman DD, Frongillo MF, Joseph SL. Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate, and febantel against giardiasis in dogs. Am J Vet Res 1998; 59(9):1134-6.
- Bernander R, Palm JE, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cell Microbiol. 2001 Jan;3(1):55-62.
- Bhattacharya A, Mishra LC, Bhasin VK. *In vitro* activity of artemisinin in combination with clotrimazole or heat-treated amphotericin B against *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg 2008; 78:721-8.
- Bingham AK, Meyer EA. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. Nature 1979; 277(5694):301-2.
- Bjørn H, Hennessy DR, Friis C. The kinetic disposition of pyrantel citrate and pamoate and their efficacy against pyrantel-resistant *Oesophagostomum dentatum* in pigs. Int J Parasitol. 1996 Dec;26(12):1375-80
- Bockman DE, Winborn WB. Electron microscopic localization of exogenous ferritin within vacuoles of *Giardia muris*. J Protozool 1968; 15(1):26-30.
- Brugerolle G. Ultrastructure of the genus *Enteromonas* da Fonseca (Zoomastigophorea) and revision of the order of Diplomonadida Wenyon. J Protozool 1975; 22(4):468-75.
- Busatti HG, Vieira AE, Viana JC, Silva HE, Souza-Fagundes EM, Martins-Filho OA, Alves RJ, Gomes MA. Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. Parasitol Res. 2007 Dec;102(1):145-9
- Campanati L, Gadelha AP, Monteiro-Leal LH. Electron and video-light microscopy analysis of the *in vitro* effects of pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. Exp Parasitol 2001; 97(1):9-14.

- Campanati L, Monteiro-Leal LH. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain). *Parasitol Res* 2002; 88(1):80-5.
- Campanati L, Troester H, Monteiro-Leal LH, Spring H, Trendelenburg MF, de Souza W. Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Histochem Cell Biol* 2003; 119(4):323-31.
- Chavez B, Cedillo-Rivera R, Martinez-Palomo A. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool* 1992; 39:510-15.
- Clark IA, Rockett KA. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol*. 1996;37:1-56.
- Corrêa G, Benchimol M. *Giardia lamblia* behavior under cytochalasins treatment. *Parasitol Res*. 2006 Feb;98(3):250-6
- Desowitz RS, Bell T, Williams J, Cardines R, Tamarua M. Anthelmintic activity of pyrantel pamoate. *Am J Trop Med Hyg*. 1970 Sep;19(5):775-8.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1478-87.
- Edlind TD, Hang TL, Chakraborty PR. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* in vitro. *J Infect Dis* 1990;162(6):1408-11.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Pawley J. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J Parasitol* 1989; 75(5):787-97.
- Fasanmade AA, Akanni AO, Olaniyi AA, Fasanmade AA, Tayo F. Bioequivalence of pyrantel pamoate dosage forms in healthy human subjects. *Biopharm Drug Dispos* 1994; 15(6):527-34.
- Faubert G, Reiner DS, Gillin FD. *Giardia lamblia*: regulation of secretory vesicle formation and loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Exp Parasitol* 1991; 72(4):345-54.
- Feely DE, Dyer JK. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *Protozool* 1987; 34(1):80-3.
- Feely DE, Gardner MD, Hardin EL. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J Parasitol* 1991; 77(3):441-8.
- Friend DS. The fine structure of *Giardia muris*. *J Cell Biol*. 1966 May;29(2):317-32.
- Gao Y, Sun Z, Liu Y, Sun X, Yurong-Li, Bao L, Wang G. Effect of albendazole anthelmintics on the enzyme activities of different tissue regions in *Eisenia fetida*. *Eur J Soil Biol* 2007; 43(1):246-51.
- Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):114-28

Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A, Sauch JF Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* *in vitro*. Science 1987; 235(4792):1040-3.

Gillin FD, Reiner DS, Boucher SE. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. Infect Immun 1988; 56(3):705-7.

Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu Rev Microbiol 1996; 50:679-705.

Grover JK, Vats V, Uppal G, Yadav S. Anthelmintics: a review. Trop Gastroenterol 2001; 22(4):180-9.

Hausen MA, Freitas JC Jr, Monteiro-Leal LH The effects of metronidazole and furazolidone during *Giardia* differentiation into cysts. Exp Parasitol 2006; 113(3):135-41.

Hetsko ML, McCaffery JM, Svärd SG, Meng TC, Que X, Gillin FD. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. Exp Parasitol. 1998 Mar;88(3):172-83

Hill DR. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. Infect Dis Clin North Am 1993; 7(3):503-25.

Holberton DV. Mechanism of attachment of *Giardia* to the wall of the small intestine. Trans R Soc Trop Med Hyg 1973; 67(1):29-30.

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

Kabnick KS, Peattie DA. *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. J Cell Sci. 1990; 95 (Pt 3):353-60.

Kane AV, Ward HD, Keusch GT, Pereira ME. *In vitro* encystation of *Giardia lamblia*: large-scale production of in vitro cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. J Parasitol 1991; 77(6): 974-81.

Katellaris PH, Naeem A, Farthing MJ. Activity of metronidazole, azithromycin and three benzimidazoles on *Giardia lamblia* growth and attachment to a human intestinal cell line. Aliment Pharmacol Ther 1994; 8(2):187-92.

Kattenbach WM, Pimenta PF, de Souza W, Pinto da Silva P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. Parasitol Res 1991; 77(8):651-8.

Kirkpatrick CE, Farrell JP. Leishmaniasis in beige mice. Infect Immun 1982; 38(3):1208-16.

Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. Clin Pharmacokinet. 1999 May;36(5):353-73

Lanfredi-Rangel A, Kattenbach WM, Diniz JA Jr, de Souza W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. FEMS Microbiol Lett 1999 15; 181(2):245-51.

Lindmark DG. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. Exp Parasitol 1988; 65(1):141-7.

Lloyd S, Gemmell MA Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel embonate, and febantel against helminth infections in dogs. Am J Vet Res 1992; 53(12):2272-3.

Luján HD, Marotta A, Mowatt MR, Sciaky N, Lippincott-Schwartz J, Nash TE. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem 1995a; 270(9):4612-8.

Luján HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. J Biol Chem 1995b 8; 270(49):29307-13.

Luján HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93 (15):7628-33

MacDonald LM, Armson A, Thompson AR, Reynoldson JA. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasitol 2004; 138(1):89-96.

Mahdi NK, Setrak SK, Shiwaish SM Diagnostic methods for intestinal parasites in southern Iraq with reference to *Strongyloides stercoralis*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993; 24(4):685-91.

Mariante RM, Vancini RG, Melo AL, Benchimol M. *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. Exp Parasitol. 2005 May;110(1):62-72.

Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H. Target sites of anthelmintics. Parasitology 1997; 114 Suppl:S111-24.

McCabe RE, Yu GS, Contreas C, Morrill PR, McMorow B. In vitro model of attachment of *Giardia intestinalis* trophozoites to IEC-6 cells, an intestinal cell line. Antimicrob Agents Chemother. 1991 Jan;35(1):29-35.

Mohammed Mahdy AK, Lim YA, Surin J, Wan KL, Al-Mekhlafi MS. Risk factors for endemic giardiasis: highlighting the possible association of contaminated water and food. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008; 102(5):465-70.

Monteiro-Leal LH, Farina M, de Souza W. Free movement of *Tritrichomonas foetus* in a liquid medium: a video-microscopy study. Cell Motil Cytoskeleton 1996; 34(3):206-14.
Müller M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. Surgery. 1983 Jan;93(1 Pt 2):165-71.

Müller J, Rühle G, Müller N, Rossignol JF, Hemphill A. In vitro effects of thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically and in coculture with Caco2 cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):162-70.

Müller J, Sterk M, Hemphill A, Müller N. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Aug;60(2):280-7.

Nolan TJ, Hawdon JM, Longhofer SL, Daurio CP, Schad GA. Efficacy of an ivermectin/pyrantel pamoate chewable formulation against the canine hookworms, *Uncinaria stenocephala* and *Ancylostoma caninum*. *Vet Parasitol*. 1992 Feb;41(1-2):121-5.

Ortega YR, Adam RD. *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis* 1997; 25(3):545-9.

Owen RL. The ultrastructural basis of *Giardia* function. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74(4):429-33.

Oxberry ME, Thompson RCA, Reynoldson JA. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spiroplasma muris* using transmission electron microscopy. *Int J Parasitol* 1994; 24:695-703.

Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E, Svard S. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 141(2): 199-207.

Pene P, Mojon M, Garin JP, Coulaud JP, Rossignol JF. Albendazole: a new broad spectrum anthelmintic. Double-blind multicenter clinical trial. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31(2):263-6.

Pérez-Arriaga L, Mendoza-Magaña ML, Cortés-Zárate R, Corona-Rivera A, Bobadilla-Morales L, Troyo-Sanromán R, Ramírez-Herrera MA. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Trop*. 2006 May;98(2):152-61

Ponce-Macotella M, Rufino-González Y, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN. *Oregano* (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitol Res*. 2006 May;98(6):557-60.

Reiner DS, McCaffery M, Gillin FD. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur J Cell Biol* 1990; 53(1):142-53.

Reiner DS, Hetsko ML, Das S, Ward HD, McCaffery M, Gillin FD. *Giardia lamblia*: absence of cyst antigens and reduced secretory vesicle formation and bile salt uptake in an encystation-deficient subline. *Exp Parasitol* 1993; 77(4):461-72.

Reiner DS, Hetsko ML, Gillin FD. A lipoprotein-cholesterol-albumin serum substitute stimulates *Giardia lamblia* encystation vesicle formation. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42(5):622-7.

Reiner DS, Hetsko ML, Meszaros JG. Calcium signaling in excystation of the early diverging eukaryote, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 2003; 278:2533-40.

Reynoldson JA, Thompson RCA, Meloni BP. The potential and possible mode of action of the benzimidazoles against *Giardia* and other protozoa. *J Pharmacol Med* 1992; 2:35–50.

Roberts-Thomson IC, Grove DI, Stevens DP, Warren KS. Suppression of giardiasis during the intestinal phase of trichinosis in the mouse. *Gut* 1976;17(12):953-8.

Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:780-4.

Schmitz H, Rokos K, Florian P, Gitter AH, Fromm M, Scholz P, Ullrich R, Zeitz M, Pauli G, Schulzke JD. Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *AIDS*. 2002 May 3;16(7):983-91

Schupp DG, Januschka MM, Sherlock LA, Stibbs HH, Meyer EA, Bemrick WJ, Erlandsen SL. Production of viable *Giardia* cysts *in vitro*: determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian gerbil. *Gastroenterology* 1988; 95(1):1-10.

Scorza AV, Radecki SV, Lappin MR. Efficacy of a combination of febantel, pyrantel, and praziquantel for the treatment of kittens experimentally infected with *Giardia* species. *J Feline Med Surg*. 2006 Feb;8(1):7-13

Seifert K, Croft SL. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):73-9.

Sheffield HG, Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am J Trop Med Hyg* 1977; 26(1):23-30.

Shield J. A study of the effectiveness of mebendazole and pyrantel pamoate as a combination anthelmintic in Papua New Guinean children. *P N G Med J* 1985; 28(1):41-4

Smith MW, Aley SB, Sogin M. Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 95:267–280.

Sousa MC, Poiaraes-Da-Silva J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Dec;43(12):2939-42.

Svärd SG, Hagblom P, Palm JE. *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Jan 21;218(1):3-7.

Troeger H, Eppele H-J, Schneider T, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 2007;56:328–35

Turchany JM, Aley SB, Gillin FD. Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infect Immun*. 1995 Nov;63(11):4550-2.

Upcroft JA, Upcroft P. Future therapeutic alternatives for combating anaerobic protozoa. *Parasitol Today*. 1998 Dec;14(6):212-4

Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan;14(1):150-64

Urbina JA, Lazardi K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Mar;37(3):580-91.

Vidal F, Vidal JC, Gadelha AP, Lopes CS, Coelho MG, Monteiro-Leal LH. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol.* 2007 Jan;115(1):25-31.

Wang DP, Yeh MK. Degradation kinetics of metronidazole in solution. *J Pharm Sci.* 1993 Jan;82(1):95-8.

Ward HD, Alroy J, Lev BI, Keusch GT, Pereira ME. Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. *Infect Immun* 1985; 49(3):629-34.

Zhong, H-L, Cao W-J, Rossignol JF, Feng M-L, Hu R-Y, Gan S-B, Tan W. Albendazole in nematode, cestode, trematode and protozoan (*Giardia*) infections. *Chin Med J (Engl. Ed.)* 1986; 99:912-5.