



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos biológicos de inibidores de topoisomerase II em**  
***Giardia intestinalis***

Mestranda: **Antonia Dalilla de Oliveira Brito**

Duque de Caxias  
2025

**Antonia Dalilla de Oliveira Brito**

**Efeitos biológicos de inibidores de topoisomerase II em  
*Giardia intestinalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ) como requisito básico para o título de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientadora:**

Dr<sup>a</sup> Ana Paula Rocha Gadelha

**Coorientadora:**

Prof<sup>a</sup> Marlene Benchimol

Duque de Caxias  
2025

**CATALOGAÇÃO NA FONTE**  
**UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS**

B862e Brito, Antonia Dalilla de Oliveira.

Efeitos biológicos de inibidores de topoisomerase II em *Giardia intestinalis*  
/ Antonia Dalilla de Oliveira Brito. – Duque de Caxias, Rio de Janeiro, 2025.  
92 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Rocha Gadelha.  
Coorientadora: Profa. Dra. Marlene Benchimol.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Rio de Janeiro, 2025.

1. Reposicionamento de fármacos. 2. Tratamento giardiase. I. Gadelha, Ana Paula Rocha. II. Benchimol, Marlene. III. Título. IV. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”.

CDD: 610

Rodrigo de Oliveira Brainer CRB-7: 6814

ANTONIA DALILLA DE OLIVEIRA BRITO

**Efeitos biológicos de inibidores de topoisomerase II em  
*Giardia intestinalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ) como requisito básico para o título de Mestre em Ciências Biomédicas.

15 de abril de 2025.

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Às 10 horas, do dia 15 de abril de 2025, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de defesa da Dissertação versando sobre o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE INIBIDORES DE TOPOISOMERASE II NO PARASITA *Giardia intestinalis*", de autoria de Antonia Dalilla de Oliveira Brito, aluna do Mestrado Acadêmico, sob orientação da Professora Ana Paula Gadelha. A sessão foi aberta pelo Prof. Sérgio Henrique Seabra, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Eduardo Lopes Torres e Profa. Rossiane Vommaro. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas Satisfatórias.

O presidente declarou a mestranda Antonia Dalilla de Oliveira Brito Aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 15 de abril de 2025.

Documento assinado digitalmente  
gov.br SERGIO HENRIQUE SEABRA  
Data: 11/07/2025 08:20:46-0300  
Verifique em <https://validar.ri.gov.br>

Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra  
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF  
Presidente da banca

Documento assinado digitalmente  
gov.br EDUARDO JOSE LOPES TORRES  
Data: 11/07/2025 12:41:14-0300  
Verifique em <https://validar.ri.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Lopes Torres  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Documento assinado digitalmente  
gov.br ROSSIANE CLAUDIA VOMMARO  
Data: 11/07/2025 12:51:42-0300  
Verifique em <https://validar.ri.gov.br>

Profa. Dra. Rossiane Vommaro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo  
Coordenador de PPG em Biomedicina  
Translacional - BIOTRANS  
UNIVERSIDADE  
UNIGRANRIO



Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo  
Coordenador Geral

Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS

**Dedico este trabalho a todos que acreditaram nos meus sonhos, vocês foram a chama que impulsionou minha jornada.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Gostaria de iniciar agradecendo a Deus**, que é, e sempre será o meu sustento, meu amigo, meu companheiro, nos momentos em que os pensamentos maus tentam me dominar Ele conversa comigo, e me diz para ser forte, e tenho tentado ser, porque Ele está comigo.

**Agradeço a minha família**, que mesmo após esses longos anos, não entendem nada do que faço, mas me apoiam mesmo assim. Enxugam minhas lágrimas, me incentivam, me fazem perguntas sobre insetos, mesmo que eu nunca tenha tido contato com nenhum nos meus trabalhos, e no fim, acham que *Giardia* é um vírus, e quem sou eu pra ir contra toda sabedoria de minha mãe dona Danúbia, mesmo em meio ao medo da morte, explico tudo da forma em que aprendi. Vocês divertem meus dias, e eu não poderia ter nascido em uma família melhor.

**Ao meu noivo**, obrigada por todas as vezes que ensaiou cada apresentação comigo, foi meu ouvinte, e me fez perguntas cabulosas que contribuíram para o meu crescimento, pessoal e acadêmico. Você é tão responsável por esse momento precioso quanto eu, afinal, se não fosse a força que recebi de ti, talvez esse momento não aconteceria tão cedo. **Aos meus amigos**, Fran, Igor, Nathy, Rafa, Gui, Julia, obrigada por me acharem a pessoa mais inteligente do mundo, por terem orgulho da minha trajetória, até mais que eu mesma, acho que amizade de verdade é isso né? Apoiar e incentivar, e isso vocês fazem com maestria. Estendo também a Ana Carolina, Vanessa e Emanuela, que me acompanham desde a graduação e deixam meus dias mais felizes, quem diria que chegaríamos todas a esse título, orgulho de nós. Aos meus amigos de pós, em especial Danilo e João, vocês foram pra mim um verdadeiro presente. Eu amo vocês, obrigada por tudo, amigos.

**A equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (UFRJ), todo o prédio CPMP e também do Laboratório de Microscopia (INMETRO)**, obrigada por sanarem minhas dúvidas e me fazerem sentir bem em todos os dias de trabalho, com vocês “fazer ciência” é mais que divertido. Aos técnicos, em especial Verônica, Mayara, Otávio e Flávio, vocês constituem

a engrenagem principal desses laboratórios, e sem a dedicação e ajuda de vocês, eu estaria completamente perdida, obrigada por sempre me ajudarem com tanto carinho e profissionalismo. **Ao meu grupo**, Daniele, Raphael, Rosilaine, Sharmila e Cassiane, obrigada por cada risada, por cada reunião, seminário e compartilhamento de conhecimento. Encontrei nesse grupo uma família, e tenho orgulho de participar de cada etapa com vocês. Espero um dia conseguir ser um pouco de cada um, ter a calma da Dani, a dedicação da Sharm, a animosidade do Rapha, a versatilidade da Rose e a tranquilidade da Cassi. Vocês contribuíram para o meu crescimento, como aluna, e como pessoa, obrigada.

**Aos Técnicos e Professores do CENABIO**, obrigada pelo excelente trabalho, em especial ao Jean, que sempre me impulsionou a me tornar independente no uso dos equipamentos, e hoje vejo o quanto isso foi importante para o meu desenvolvimento.

**Ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, BIOTRANS**, obrigada por me aceitarem, por cada aula, cada ensino, cada atividade que contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal. É uma honra fazer parte de um programa tão qualificado, que se preocupa em oferecer um ensino de excelência.

**Em especial a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Paula Gadelha**, por todo incentivo, por todas as conversas, por acreditar em mim até quando eu mesma não acreditava, por estar comigo nos seus momentos ruins, e também nos meus. Ana, uma mulher pequena e cheia de graça, literalmente, você é o verdadeiro significado de “não soltar a mão”, trabalhar com você durante todos esses anos me ensinou como uma verdadeira orientadora deve ser, e espero um dia me tornar pelo menos metade da profissional que você é. Obrigada por cada ensinamento, por cada tempo na bancada, por cada técnica repassada. Se hoje cheguei a esse dia, foi porque primeiro você acreditou em mim, e eu sou grata pela sua confiança, e espero um dia conseguir retribuir tudo isso. Obrigada Ana, de coração.

**Em especial a Profa. Marlene**, por cada ajuda, por cada momento de conversa, por cada dica, por cada aula, por cada lição de vida. Sua garra e história na ciência me impulsiona a querer aprender cada dia mais, suas aulas me mostraram como é aprender com uma pessoa que é completamente apaixonada pelo que faz, e espero um dia conseguir repassar essa paixão pela ciência, mesmo que só um pouco. Obrigada por dividir essa tarefa de orientação com a Profa. Ana, sei o quão trabalhoso isso é, mesmo assim não mediu esforços para me ajudar, e estava sempre de prontidão. Obrigada por tudo.

**Agradeço as agências de fomento**, CNPq, CAPES e FAPERJ por toda ajuda financeira, ao projeto e aos laboratórios, contribuindo para que esse projeto pudesse acontecer.

**Com todo o carinho e gratidão, dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a minha trajetória. A cada gesto de apoio, incentivo ou orientação, meu mais sincero e profundo agradecimento. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional, e levo comigo a importância de cada um nesse caminho. Muito obrigada.**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

## Resumo

As doenças parasitárias, sobretudo as causadas por protozoários, constituem um dos principais problemas de Saúde Pública nos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil. Dentre elas, podemos destacar a giardíase, uma infecção do trato digestório que é causada pelo protozoário *Giardia intestinalis*. A giardíase é uma das parasitoses mais comuns em todo o mundo e está incluída na Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (DNDi/OMS) desde 2004. O tratamento da giardíase baseia-se em fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis e benzimidazóis, que apresentam uma série de efeitos adversos. Além disso, cresce a cada ano o relato de resistência parasitária aos compostos de uso clínico. Desta forma, a busca por novos fármacos mais eficientes e seguros para o paciente é de extrema importância. Os inibidores de topoisomerase tornam-se alternativas interessantes uma vez que essas moléculas mostram atividade antiparasitária. Frente a isto, no presente estudo estamos avaliarmos os efeitos de três inibidores de topoisomerase II, o ácido nalidíxico, a enoxacina e a norfloxacina, em trofozoítos de *G. intestinalis*. Dentre os compostos avaliados, o sal sódico do ácido nalidíxico demonstrou a maior eficiência, reduzindo tanto a proliferação quanto a atividade metabólica do parasito, obtendo um valor de IC<sub>50</sub> de 4,3 µM e um índice de seletividade de 62,97. As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram a retração da região caudal da célula, bem como a diminuição do número de flagelos externalizados após o tratamento. Complementarmente, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciou a formação de vacúolos contendo figuras mielínicas, bem como a presença de flagelos em vacúolos, após a incubação com o composto sal sódico do ácido nalidíxico. Os ensaios do ciclo celular indicaram um aumento na porcentagem de células na fase G2/M após a exposição ao fármaco. Os dados apresentados reforçam que os inibidores de topoisomerase II exercem efeitos significativos sobre a proliferação e a organização estrutural dos trofozoítos de *G. intestinalis*, indicando seu potencial como alternativas promissoras no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da giardíase.

Palavras-chave: Reposicionamento de fármacos; tratamento giardíase.

## Abstract

Parasitic diseases, especially those caused by protozoa, are one of the main public health problems in developing countries, including Brazil. Among them, we can highlight giardiasis, an infection of the digestive tract caused by the protozoan *G. intestinalis*. Giardiasis is one of the most common parasitic diseases worldwide and has been included in the World Health Organization's Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi/WHO) since 2004. Treatment of giardiasis is based on drugs from the 5-nitroimidazole and benzimidazole classes, which have a series of side effects. Additionally, reports of parasitic resistance to compounds in clinical use are increasing annually. Therefore, the search for new, more efficient and safer drugs for patients is extremely important. Topoisomerase inhibitors are an interesting alternative, as these molecules exhibit antiparasitic activity. Given this, in the present study we are evaluating the effects of three topoisomerase II inhibitors, nalidixic acid, enoxacin and norfloxacin, on *G. intestinalis* trophozoites. Among the compounds evaluated, the sodium salt of nalidixic acid demonstrated the greatest efficiency, reducing both the proliferation and the metabolic activity of the parasite, obtaining an IC<sub>50</sub> value of 4.3 μM and a selectivity index of 62.97. Scanning electron microscopy (SEM) analyses revealed retraction of the caudal region of the cell, as well as a decrease in the number of externalized flagella after treatment. In addition, transmission electron microscopy (TEM) revealed the formation of vacuoles containing myelin figures, as well as the presence of flagella within these vacuoles, following incubation with the sodium salt of nalidixic acid. Cell cycle assays indicated an increase in the percentage of cells in the G2/M phase after drug exposure. The data presented reinforce that topoisomerase II inhibitors exert a significant effect on the proliferation and structural organization of *G. intestinalis* trophozoites, indicating their potential as promising alternatives in the development of drugs for the treatment of giardiasis.

Keywords: Drug repositioning; giardiasis treatment.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.1. <i>Giardia intestinalis</i></b>                                | <b>11</b> |
| <b>1.2. Giardíase</b>  | <b>14</b> |
| <b>1.2.1. Diagnóstico da giardíase</b>                                 | <b>16</b> |
| <b>1.3. Epidemiologia</b>  | <b>17</b> |
| <b>1.4. Ciclo Biológico</b>  | <b>19</b> |
| <b>1.5. Morfologia do Cisto</b>  | <b>21</b> |
| <b>1.6. Morfologia do Trofozoíto</b>                                   | <b>22</b> |
| 1.6.1. Núcleos e nucléolos   | 24        |
| 1.6.2. Mitossomos  | 26        |
| 1.6.3. Retículo endoplasmático e Complexo de Golgi                     | 26        |
| 1.6.4. Vesículas Periféricas (VPs)                                     | 27        |
| <b>1.6.5. Microtúbulos</b>   | <b>27</b> |
| 1.6.5.1. Flagelos  | 28        |
| 1.6.5.2. Disco Ventral   | 29        |
| 1.6.5.3. Funis   | 31        |
| 1.6.5.4. Corpo mediano   | 31        |
| <b>1.7. Tratamento da giardíase</b>                                    | <b>31</b> |
| <b>1.8. O alvo dos agentes quimioterápicos</b>                         | <b>34</b> |
| <b>1.9. Inibidores de topoisomerase e reposicionamento de fármacos</b> | <b>36</b> |
| <b>1.10. <i>Giardia</i> e as topoisomerasas</b>                        | <b>38</b> |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>  | <b>39</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b>  | <b>41</b> |
| 3.1. Objetivo Geral  | 41        |
| 3.2. Objetivos específicos   | 41        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                      | <b>42</b> |
| 4.1. Compostos                                     | 42        |
| 4.2. Cultivo dos parasitos                         | 43        |
| 4.3. Cultivo das células intestinais humanas       | 43        |
| 4.4. Curva de crescimento                          | 44        |
| 4.4.1. Cálculo de IC <sub>50</sub>                 | 45        |
| 4.5. Atividade metabólica dos trofozoítos          | 45        |
| 4.6. Análise da toxicidade em células de mamíferos | 46        |
| 4.7. Ensaio de reversibilidade                     | 47        |
| 4.8. Imunofluorescência                            | 47        |
| 4.8.1. Análise do citoesqueleto                    | 47        |
| 4.8.2. Avaliação da fragmentação nuclear           | 48        |
| 4.8.3. Parede cística                              | 48        |
| 4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)     | 49        |
| 4.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)  | 49        |
| 4.11. Ciclo celular                                | 50        |
| 4.12. Análise estatística                          | 51        |
| <b>5. RESULTADOS</b>                               | <b>51</b> |
| 5.1. Ensaio de proliferação                        | 51        |
| 5.2. Atividade metabólica                          | 55        |
| 5.3. Ensaio de reversibilidade                     | 57        |
| 5.4. Ciclo celular                                 | 58        |
| 5.5. Imunofluorescência                            | 60        |
| 5.6. Efeitos na ultraestrutura de superfície       | 62        |
| 5.7. Caracterização do citoesqueleto               | 66        |
| 5.8. Avaliação da ultraestrutura intracelular      | 68        |
| 5.9. Fragmentação nuclear                          | 69        |
| 5.10. Imunofluorescência para identificação do     | 72        |

**encistamento/cistos**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.11. Avaliação da toxicidade em células epiteliais<br/>intestinais humanas Caco-2</b> | <b>73</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>   | <b>75</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES</b>  | <b>83</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS</b>   | <b>83</b> |

## Lista de abreviaturas

**Caco-2** - *Caucasian Colon Adenocarcinoma*

**CDC** - Controle de Prevenção em Doenças

**CPN60**- Chaperona 60

**CWP** - Proteínas da Parede do Cisto

**DV ou D** - Disco ventral

**DDAs** -Doenças Diarreicas Agudas

**DTNs** - Doenças Tropicais Negligenciadas

**ECVs** - Vesículas Positivas para Carboidratos

**ESVs** - Vesículas Específicas de Encistamento

**EUA** - Estados Unidos da América

**FDA** - *Food & Drug Administration*

**FeS** - Ferro- enxofre

**GITop 2** - Topoisomerase II de *Giardia*

**IC 50**- Metade da concentração inibitória máxima

**MAL-ED** - Estudo Etiologia, Fatores de Risco e Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição e Consequências para a Saúde Infantil

**MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**MTOCs** - Centro Organizador de Microtúbulos

**MTs** - Microtúbulos

**MTS** - [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolium

**MTZ** - Metronidazol

**MYB2**- Proteína 2 do Domínio MYB

**NaOH** - Hidróxido de Sódio

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PMS**- Metosulfato de Fenazina

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**VPs** – Vesículas Periféricas

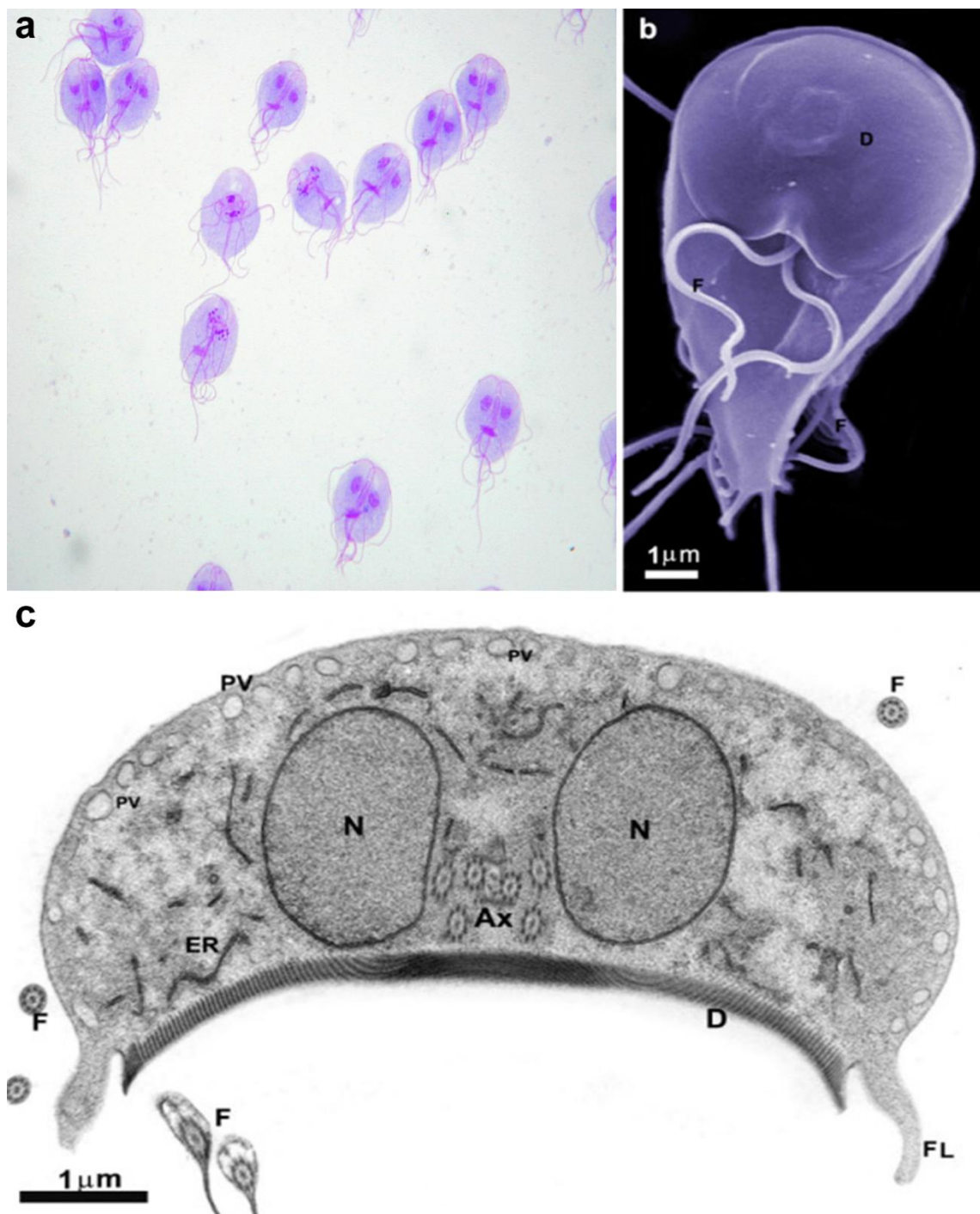
**VSP** – Proteínas Variantes de Superfície

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Giardia intestinalis*

O protozoário *Giardia intestinalis*, também denominada *Giardia lamblia* ou *Giardia duodenalis* (**Fig. 1**), é um enteroparasito zoonótico extracelular e não invasivo, que se adere ao intestino delgado de hospedeiros vertebrados, ocasionando a patologia diarreica denominada giardíase (CERNIKOVA *et al.*, 2018). A *Giardia intestinalis* foi descrita pela primeira vez em 1681 por Antonie van Leeuwenhoek, ao examinar suas próprias fezes diarreicas usando um microscópio rudimentar de lente única. Em 1859, o médico checo Vilém Dušan Lambl forneceu uma descrição mais detalhada, classificando erroneamente o microrganismo no gênero *Cercomonas* e denominando-o *Cercomonas intestinalis*. Posteriormente, alguns pesquisadores batizaram o gênero em sua homenagem, enquanto outros associaram seu nome às espécies que acometem humanos. Desde a década de 1980, o uso da denominação *G. duodenalis* foi incentivado por alguns estudiosos, enquanto, na década de 1990, outros pesquisadores promoveram a adoção do nome *G. intestinalis* (ADAM, 2001).

Trata-se de um protozoário flagelado pertencente à Classe Zoomastigofora e à Ordem Diplomonadida, integrando a Família Hexamitidae (ADAM, 2001). Seu ciclo de vida compreende duas formas principais: a trofozoítica, responsável pela manifestação clínica da doença, e a cística, envolvida na transmissão do parasito (GUTIÉRREZ, 2017). *G. intestinalis* compreende oito grupos ou genótipos distintos, geneticamente heterogêneos, os quais são organizados em categorias designadas de A a H, cotados de acordo com o hospedeiro dominante como mostrado no **Quadro 1**: (1) *G. intestinalis* comumente infecta humanos e demais mamíferos; (2) *Giardia muris* identificada em roedores; (3) *Giardia agilis* em anfíbios; (4) *Giardia ardeae* em garças, (5) *Giardia psittaci* em aves; (6) *Giardia microti* em ratazanas; (7) *Giardia peramelis* em quenda; (8) *Giardia cricetidarum* em hamster (GRÜTTNER J *et al.*, 2023; LYU *et al.*, 2018).



33 **Figura 1. *G. intestinalis* visualizadas usando diferentes técnicas de**  
 34 **microscopia. (a) Trofozoítos corados com Giemsa, observados por microscopia**  
 35 **de luz. (b) Superfície ventral do trofozoíto, observada por microscopia eletrônica**  
 36 **de varredura. (c) Corte transversal do trofozoíto observado por microscopia**  
 37 **eletrônica de transmissão, evidenciando suas principais estruturas. N- Núcleos; D**  
 38 **- Disco ventral; PVs - Vesículas periféricas; AXs - Axonemas; F - Flagelos; ER-**  
 39 **perfis do retículo endoplasmático; FL- Flange. (Imagem 1a: Lipoldová, 2014;**  
 40 **Imagem 1b-c: Benchimol *et al.*, 2023).**

42

| <b>Espécies</b>        | <b>Hospedeiro</b>                                | <b>Morfologia</b>  |
|------------------------|--|--|
| <i>G. intestinalis</i> | <b>Mamíferos, incluindo seres humanos e cães</b> | Forma de pera com corpos medianos em forma de garra  |
| <i>G. agilis</i>       | <b>Anfíbios</b>                                  | Mais longo e delgado que <i>G. intestinalis</i>  |
| <i>G. ardeae</i>       | <b>Garças</b>                                    | Semelhante à <i>G. intestinalis</i>  |
| <i>G. cricetidarum</i> | <b>Hamster</b>                                   | Os trofozoítos são geralmente maiores e mais robustos do que a maioria dos outros          |
| <i>G. microti</i>      | <b>Ratos-do-campo e ratos-almiscarados</b>       | Semelhante à <i>G. intestinalis</i>  |
| <i>G. muris</i>        | <b>Roedores</b>                                  | Mais curto e mais redondo que <i>G. intestinalis</i> , corpo mediano pequeno e arredondado |
| <i>G. psittaci</i>     | <b>Pássaros psitacídeos</b>                      | Semelhante à <i>G. intestinalis</i>  |
| <i>G. peramelis</i>    | <b>Quenda</b>                                    | Semelhante à <i>G. intestinalis</i>  |

43 **Quadro 1: Espécies de *Giardia* e seus hospedeiros.** Diferentes espécies,  
 44 hospedeiros e morfologia são indicados. Fonte: GUTIÉRREZ, 2017.  
 45

46 Apesar de ser uma célula eucariótica, o parasito exhibe várias  
 47 propriedades procarióticas, tais como SSU rRNA (*Small subunit* ribosomal  
 48 ribonucleic acid, 1453 bases) de tamanho procariótico e enzimas  
 49 metabólicas similares às enzimas de bactérias. Em razão disso, possui  
 50 grande importância nos estudos de evolução de organismos, uma vez que  
 51 se identificaram semelhanças entre o gene *cpn60* de *Giardia* e um gene da  
 52  $\alpha$ -proteobactéria, considerada evolutivamente mais próximo dos  
 53 procariontes que originaram as mitocôndrias (ROGER *et al.*, 1998). Nesse

54 contexto, foi proposto que, em algum estágio evolutivo, *G. intestinalis* pode  
55 ter possuído mitocôndrias, mas as perdeu ao longo do tempo como parte  
56 de seu processo de adaptação. Dessa forma, *G. intestinalis* é um eucarioto  
57 altamente diverso, o que proporciona oportunidades únicas para a  
58 obtenção de informações fundamentais sobre os principais atributos das  
59 células eucarióticas, além de possibilitar a identificação de novos  
60 mecanismos moleculares (SVÄRD *et al.*, 2003).

61

## 62 **1.2. Giardíase**

63 Por muito tempo a giardíase estabeleceu-se como uma doença  
64 subestimada e negligenciada, apesar de seu elevado número de casos em  
65 nível global. Isso se deve, em grande parte, ao fato de a maioria dos  
66 indivíduos ser assintomática ou manifestar apenas diarreia como sintoma  
67 mais evidente (FUSARO *et al.*, 2022). Em maior parte, a prevalência da  
68 giardíase é um dos melhores indicadores do *status* socioeconômico de  
69 uma região e pode estar associada a diversos determinantes, como  
70 contaminação da água e de alimentos, instalações sanitárias inadequadas,  
71 deficiência no saneamento básico e pobreza (BELO *et al.*, 2012). Embora  
72 seja prevalente em locais onde há condições precárias de vida, a giardíase  
73 pode acometer indivíduos em qualquer classe social e econômica. No  
74 Brasil, apesar dos avanços na infraestrutura e nos níveis educacionais nos  
75 últimos anos, persistem disparidades regionais significativas. Na região  
76 Sudeste, 82,3% das residências possuem sistemas de saneamento  
77 adequados, enquanto na região Norte essa cobertura é de apenas 22,4%.  
78 Grande parte dessa desigualdade resulta das diferenças nos serviços de  
79 saneamento entre as distintas regiões do país (COELHO *et al.*, 2017).

80 Além de fazer parte do grupo das Doenças Diarreicas Agudas  
81 (DDAs) no Brasil, em 2004, a giardíase foi incorporada à Iniciativa sobre  
82 Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (NDI/OMS)  
83 (SAVIOLI *et al.*, 2006). As doenças negligenciadas englobam um grupo de  
84 doenças parasitárias, bacterianas ou virais que ocorrem  
85 predominantemente em regiões de clima tropical e subtropical. Essas

86 doenças desenvolvem-se, sobretudo, em países subdesenvolvidos, onde a  
87 pobreza é amplamente disseminada e o acesso ao saneamento básico é  
88 limitado. De acordo com Savioli *et al.* (2006), as doenças negligenciadas  
89 causadas por protozoários intestinais são comuns em todo o mundo. A  
90 Organização Mundial da Saúde estima que essas doenças resultem em  
91 mais de 500 mil casos e gerem custos superiores a 100 milhões de dólares.  
92 Segundo dados epidemiológicos, a giardíase afeta cerca de 33% da  
93 população em países emergentes, enquanto nos países de alta renda, sua  
94 prevalência é de aproximadamente 2% entre os adultos e de 6 a 8% entre  
95 as crianças.

96 A giardíase pode se manifestar de diversas formas no indivíduo,  
97 apresentando uma ampla variedade de sintomas, que variam desde casos  
98 assintomáticos até quadros de diarreia grave, tanto agudos quanto  
99 crônicos (HALLIEZ & BURET, 2013). Os sintomas geralmente surgem  
100 dentro de 2 semanas após a ingestão dos cistos, embora a infecção  
101 assintomática ou subclínica seja comum. A fase aguda é frequentemente  
102 caracterizada por diarreia, cólicas, náuseas e vômitos, geralmente  
103 acompanhados de fadiga e perda de peso (LALLE & HANEVIK, 2018). O  
104 parasito pode causar distúrbios tanto durante a fase aguda da infecção  
105 quanto após a recuperação, manifestando-se como síndrome do intestino  
106 irritável pós-infecciosa e fadiga crônica. Além disso, a giardíase pode  
107 resultar em uma variedade de complicações extraintestinais, como  
108 redução da função cognitiva, patologias oculares, artrite, alergias, miopatia  
109 hipocalêmica e até mesmo foi associada ao câncer (HALLIEZ & BURET,  
110 2013). Deficiências de proteínas, vitamina A e zinco, comuns em crianças  
111 desnutridas, podem aumentar a predisposição à infecção por *G. intestinalis*  
112 (ALLAIN & BURET, 2020). À medida que o parasito é eliminado, os  
113 sintomas desaparecem. No entanto, em alguns pacientes, a infecção pode  
114 evoluir para uma forma crônica, perdurando por meses ou anos, com ou  
115 sem sintomas.

116 Embora exista tratamento disponível, a giardíase é especialmente  
117 preocupante quando afeta crianças e indivíduos imunocomprometidos

118 (BURET, 2008). O emagrecimento e o comprometimento cognitivo foram  
119 associados à giardíase em crianças, e a infecção precoce persistente por  
120 *G. intestinalis* foi relacionada ao nanismo aos 2 anos de idade, conforme  
121 evidenciado no estudo MAL-ED (Etiologia, Fatores de Risco e Interações  
122 de Infecções Entéricas e Desnutrição e Consequências para a Saúde e  
123 Desenvolvimento Infantil) (ROGAWSKI *et al.*, 2017).

### 124 **1.2.1. Diagnóstico da giardíase**

125 A identificação de *G. intestinalis* por microscopia em amostras fecais  
126 é considerada o método padrão-ouro para o diagnóstico da giardíase,  
127 sendo capaz de detectar cistos e, com menor frequência, trofozoítos, uma  
128 vez que estes não são frequentemente eliminados nas fezes. Nesse  
129 sentido, a sedimentação em água, a centrífugo-flotação em sulfato de  
130 zinco e a centrífugo-sedimentação são os métodos coproparasitológicos  
131 mais utilizados na rotina laboratorial (BEZAGIO *et al.*, 2021).

132 O uso de anticorpos fluorescentes (ou ensaio de  
133 imunofluorescência, IFA) aprimorou a sensibilidade e a especificidade da  
134 microscopia, mas ainda é um processo demorado e exige um  
135 microscopista experiente. Para superar algumas das limitações associadas  
136 à microscopia, testes rápidos de detecção de antígeno fecal, incluindo  
137 imunocromatográfico e ensaio imunoenzimático (ELISA), foram  
138 desenvolvidos e são utilizados (DIXON, 2021). Atualmente, o ensaio  
139 imunoenzimático ELISA é o mais utilizado entre os ensaios imunológicos,  
140 devido à sua alta sensibilidade, que varia de 85% a 100%. Além disso,  
141 esse método é útil no diagnóstico, pois elimina os resultados falso-  
142 negativos que podem ocorrer com o exame parasitológico por microscopia  
143 ou outras técnicas (HOOSHYAR *et al.*, 2019).

144 Os métodos moleculares são amplamente empregados em países  
145 desenvolvidos para a detecção de *G. intestinalis* em humanos e animais, e  
146 têm contribuído significativamente para a compreensão dos padrões de  
147 transmissão. Os métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da  
148 Polimerase), em particular, são rápidos e objetivos em comparação com a  
149 microscopia, permitindo a identificação de espécies por meio de

150 sequenciamento de DNA, detecção de múltiplos alvos por multiplexação e  
151 quantificação dos resultados (DIXON, 2021). A sequência do gene alvo  
152 utilizada em diversos estudos moleculares de espécies de *Giardia* inclui  
153 genes que codificam RNA ribossômico da subunidade pequena, glutamato  
154 desidrogenase, triosefosfato isomerase e genes de  $\beta$ -giardina (uma  
155 proteína presente no disco ventral de *G. intestinalis*) (HOOSHYAR *et al.*,  
156 2019).

### 157 **1.3. Epidemiologia**

158 A condição socioeconômica mais baixa está frequentemente  
159 associada a uma maior incidência da doença, devido ao maior risco de  
160 exposição à água contaminada em comunidades vulneráveis. Embora a  
161 epidemiologia da transmissão seja altamente variável e permaneça objeto  
162 de debate, a giardíase é considerada uma antropozoonose, uma zoonose  
163 que pode ser transmitida de animais para humanos (COELHO *et al.*, 2017).  
164 Em países industrializados, padrões sanitários mais elevados restringem a  
165 disseminação do parasita, fazendo com que a giardíase seja considerada  
166 uma infecção reemergente, principalmente associada a surtos  
167 relacionados a viagens e transmissão por água. No entanto, foram  
168 relatados casos esporádicos de giardíase, aparentemente adquiridos  
169 localmente e não associados a histórico de viagens, os quais  
170 provavelmente são subdiagnosticados (LALLE & HANEVIK, 2018). Por  
171 outro lado, países subdesenvolvidos, onde há muitos locais com alto nível  
172 de pobreza e onde o acesso a saneamento básico é escasso,  
173 principalmente em áreas onde não há tratamento e distribuição de água  
174 potável, a giardíase se torna mais frequente. Em uma pesquisa conduzida  
175 por Simsek *et al.*, em 2009, na Turquia, a prevalência de infecção  
176 parasitária intestinal foi analisada em 299 manipuladores de alimentos de  
177 Sanliurfa, localizada no sudeste da Anatólia. Os resultados revelaram que  
178 52,20% dos indivíduos estavam contaminados por parasitos intestinais,  
179 sendo que a maioria deles (26,80%) estava infectada por *G. intestinalis*.  
180 No Irã, a prevalência de infecções parasitárias intestinais em  
181 manipuladores de alimentos foi avaliada durante 19 anos (de 2000 a 2019).  
182 A análise de subgrupo indicou que *G. intestinalis*, com uma prevalência de

183 41,0% [IC 95%: 25,0-59,0%], apresentou a maior taxa de infecção entre  
184 todos os parasitos intestinais (SHARIFI-SARASIABI *et al.*, 2021).

185 Nos Estados Unidos, estima-se que a giardíase afete 1,2 milhão de  
186 indivíduos, resultando em 3.584 hospitalizações por ano. A condição, no  
187 entanto, geralmente não é reconhecida e é subnotificada porque 50 a 75%  
188 das infecções por *Giardia* são assintomáticas (LEUNG *et al.*, 2019). A  
189 maioria dos casos ocorre durante os meses de verão e no início do outono,  
190 devido ao aumento do contato com água contaminada em atividades ao ar  
191 livre, como banhos em rios e lagos, camping e viagens para áreas com  
192 saneamento precário, tendo maior exposição a fontes de água não tratada,  
193 facilitando a transmissão fecal-oral do parasito (CDC, 2024). A  
194 apresentação clínica da giardíase exibe uma distribuição etária bimodal,  
195 com picos nas faixas etárias de 1 a 9 anos e 45 a 49 anos. A condição é  
196 ligeiramente mais comum em homens (YODER *et al.*, 2010). Embora a  
197 giardíase seja geralmente uma doença esporádica, surtos em creches,  
198 bem como surtos transmitidos por água e alimentos, são frequentes. Por  
199 outro lado, em países desenvolvidos como Alemanha e Reino Unido, a  
200 giardíase é geralmente considerada uma doença rara, afetando  
201 principalmente viajantes que estiveram em regiões endêmicas  
202 (GUTIÉRREZ, 2017).

203 Infelizmente, não existe uma vacina humana disponível contra a  
204 giardíase, e as opções de tratamento medicamentoso apresentam eficácia  
205 variável. Há uma vacina veterinária, chamada GiardiaVax, composta por  
206 lisados celulares totais de uma mistura de isolados de ovelhas, cães e  
207 humanos, que reduz os sintomas e a duração da produção de cistos em  
208 cães e gatos (DAVIDS *et al.*, 2019). De maneira surpreendente, a vacina foi  
209 utilizada como agente imunoterapêutico em cães com giardíase crônica  
210 que não responderam ao tratamento medicamentoso padrão, levantando a  
211 possibilidade de que uma vacina contra *G. intestinalis* poderia ser eficaz  
212 após a exposição (DAVIDS *et al.*, 2019). No entanto, preparações de  
213 antígenos mal definidos não são recomendadas para vacinas humanas,  
214 pois são difíceis de padronizar e apresentam um risco maior de efeitos  
215 adversos. Nunca foi relatada a utilização de *G. intestinalis* atenuada; tais

216 formas provavelmente não causariam infecção no hospedeiro e, portanto,  
217 não atuariam a imunidade da mucosa (DAVIDS *et al.*,2019).

218 No Brasil, um levantamento da presença de *G. intestinalis* em  
219 águas superficiais utilizadas como fontes de abastecimento por sistemas  
220 públicos de água em quatro regiões densamente urbanizadas do estado  
221 de São Paulo foi realizado. Com base nas concentrações de protozoários  
222 detectadas, foi conduzida uma avaliação quantitativa de risco  
223 microbiológico com o objetivo de estimar a probabilidade de infecção  
224 associada à ingestão de água potável. No total, foram analisadas 206  
225 amostras de água bruta ao longo de um período de 24 meses, a presença  
226 de *G. intestinalis* foi positiva em 102 dessas amostras (SATO *et al.*, 2013).  
227 Também foram identificadas diversas espécies de *Giardia* em animais  
228 domésticos, evidenciando a relevância epidemiológica dos animais  
229 domésticos na manutenção e disseminação de cistos no ambiente  
230 (FANTINATTI *et al.*, 2021). O mais recente relatório do Sistema de  
231 Informações Hospitalares do SUS (SAÚDE, 2023) registra 349 internações  
232 por giardíase no período de 2017 a 2023. No entanto, observa-se a  
233 escassez de dados epidemiológicos no país que contemplem casos  
234 assintomáticos ou quadros clínicos com sintomas leves, o que pode levar à  
235 subnotificação da doença.

#### 236 **1.4. Ciclo Biológico**

237 O protozoário *Giardia* possui um ciclo de vida monoxênico,  
238 completando seu desenvolvimento em um único hospedeiro por meio de  
239 dois estágios distintos: o cisto infeccioso e o trofozoíto proliferativo (**FIG. 2**).  
240 A transmissão em humanos pode ocorrer de forma direta, quando a  
241 contaminação acontece de pessoa para pessoa por meio de mãos  
242 contaminadas, contendo cistos, ou de forma indireta, através da ingestão  
243 de água, verduras ou frutas cruas não devidamente higienizadas . A via  
244 indireta, especialmente pela ingestão de cistos presentes na água, é o  
245 principal modo de transmissão (DIXON, 2021). Segundo o CDC (Centro de  
246 Controle e Prevenção de Doenças, EUA), uma pessoa infectada pode  
247 eliminar de 1 a 10 milhões de cistos por dia nas fezes, o que permite que a

248 cadeia de transmissão da doença persista por vários meses. Estudos  
249 destacam que a ingestão de apenas 10 cistos é suficiente para causar a  
250 infecção (EMERY-CORBIN *et al.*, 2019).

251 O ciclo começa com a ingestão de cistos pelo hospedeiro (**FIG. 2 -**  
252 **etapa 2**), no estômago, inicia-se o processo de desencistamento (**FIG. 2 -**  
253 **etapa 2**), onde a parede do cisto é sensibilizada pelo contato com o pH  
254 ácido e as enzimas gástricas. Esse processo se completa no duodeno,  
255 devido à ação das enzimas pancreáticas e ao pH mais alcalino. O  
256 processo de desencistamento culmina na liberação de dois trofozoítos a  
257 partir de um único cisto. No intestino delgado, os trofozoítos (**FIG. 2 -**  
258 **etapa 3**) dão início à fissão binária (**FIG. 2 - etapa 4**), promovendo sua  
259 replicação (BURET, 2008). Por meio de seus quatro pares de flagelos, os  
260 trofozoítos deslocam-se no fluido luminal, penetram na camada de muco e  
261 aderem às células do epitélio intestinal utilizando o disco ventral (GILLIN &  
262 REINER, 1996), formando, assim, uma monocamada (**FIG. 2 - etapa 5**). A  
263 interação com o epitélio intestinal desencadeia uma inflamação local,  
264 caracterizando o quadro clínico da giardíase. Estudos anteriores  
265 demonstraram que essa interação entre o parasito e a célula hospedeira  
266 pode causar alterações no complexo juncional do epitélio intestinal, induzir  
267 apoptose nas células intestinais, degradar fatores imunológicos do  
268 hospedeiro (como quimosinas e imunoglobulinas), promover a depleção do  
269 muco e desencadear disbiose intestinal (ALLAIN *et al.*, 2019; DI GENOVA  
270 & TONELLI, 2016).

271 Durante o processo de divisão, os trofozoítos desprendem-se do  
272 epitélio intestinal. Ao caírem na luz intestinal, são conduzidos pelo fluxo de  
273 fluidos e pela motilidade do intestino. Ao atingirem o íleo, em contato com  
274 os sais biliares presentes no lúmen e o pH levemente mais alcalino, os  
275 trofozoítos diferenciam-se em cistos por meio de um processo denominado  
276 encistamento (**FIG. 2 - etapa 6**). Uma vez formados, os cistos são  
277 eliminados nas fezes (**FIG. 2 - etapa 7**), onde permanecem no ambiente  
278 até serem ingeridos por outro hospedeiro, reiniciando o ciclo (ALLAIN *et al.*,  
279 2019).

280

281

282

283

284

285

286

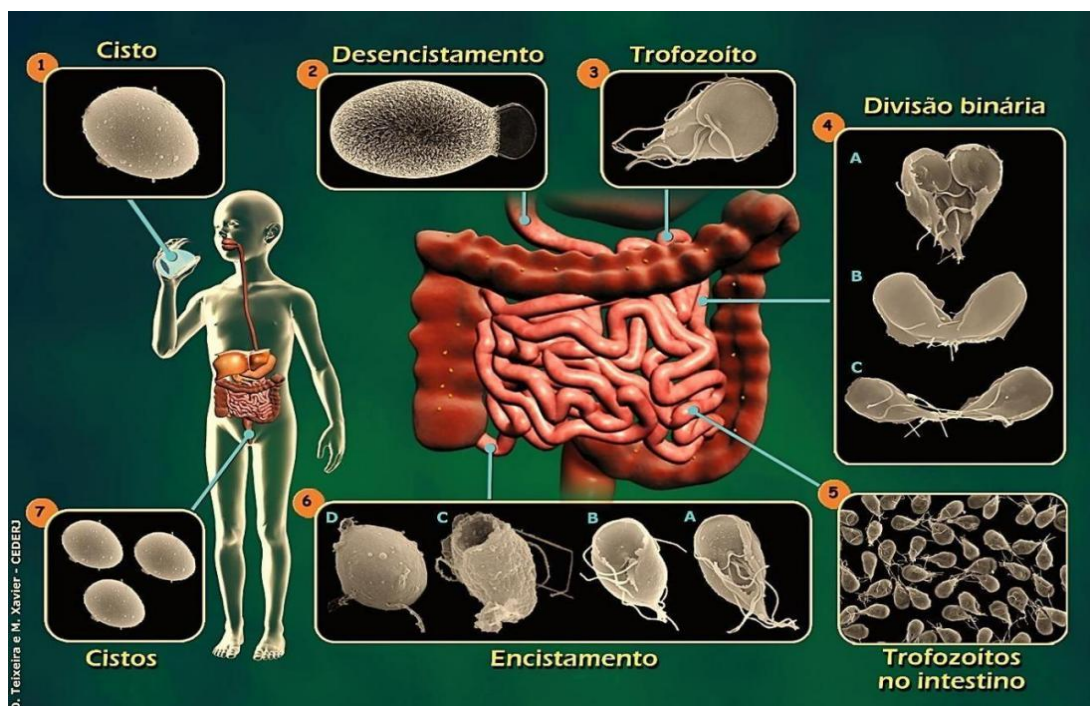
287

288

289

290

291



292 **Figura 2. Esquema do ciclo de vida de *G. intestinalis*.** O ciclo de vida de *G.*  
 293 *intestinalis* ocorre em sete etapas principais: (1) Ingestão de cistos presentes em  
 294 água ou alimentos contaminados; (2) Desencistamento, no qual o cisto se  
 295 diferencia em trofozoito; (3) Trofozoito, forma vegetativa que se adere às células  
 296 epiteliais do intestino delgado; (4) Divisão binária dos trofozoítos. (5) Formação  
 297 de uma monocamada de trofozoítos sobre as células intestinais; (6) Encistamento,  
 298 onde os trofozoítos se diferenciam novamente em cistos.; (7) Eliminação dos  
 299 cistos nas fezes. **Fonte:** Benchimol *et al.*, 2022.

300

### 301 1.5. Morfologia do Cisto

302 Os cistos de *G. intestinalis* possuem formato oval, com comprimento  
 303 variando entre 6 e 10  $\mu\text{m}$  (**FIG. 3**). Apresentam de dois a quatro núcleos, sendo  
 304 que os flagelos estão interiorizados e localizados em uma região chamada  
 305 espaço peritrófico, enquanto o disco ventral encontra-se fragmentado. A parede  
 306 cística é composta por uma camada externa filamentosa e uma camada interna,  
 307 que consiste em duas membranas, localizadas entre a membrana plasmática do  
 308 parasito e a parede. Estudos indicam que as camadas filamentosas da parede  
 309 cística são formadas por 57% de proteínas e 43% de carboidratos. As principais  
 310 proteínas da parede do cisto foram identificadas como Cyst Wall Protein (CWP)  
 311 1, 2 e 3. O carboidrato predominante na parede cística é o homopolímero de  
 312  $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-galactosamina (DE SOUZA *et al.*, 2004). A parede do cisto

313 possui uma relativa permeabilidade seletiva a componentes como água, íons e  
 314 pequenas moléculas (MIDLEJ *et al.*, 2017; ALLAIN *et al.*, 2019; KIM & PARK,  
 315 2019).

316

317

318

319

320

321

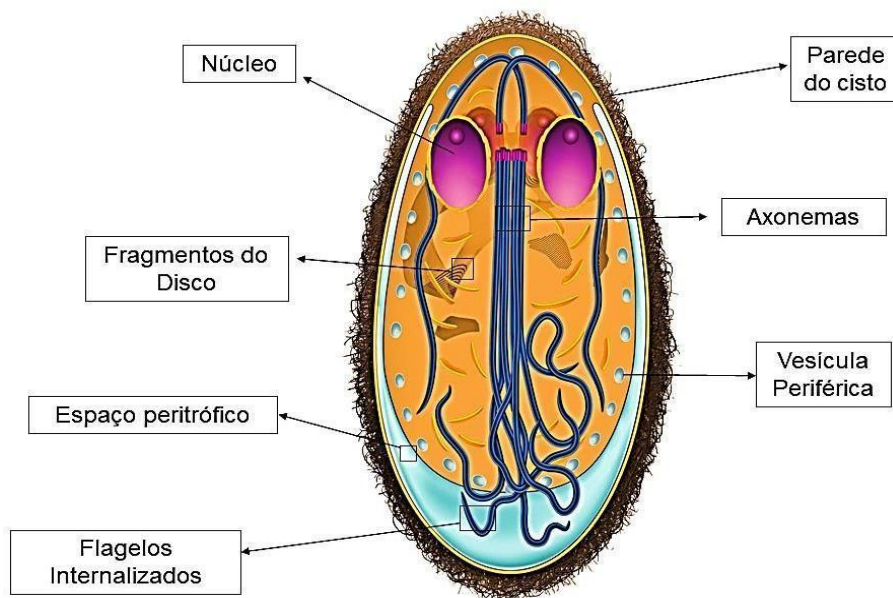
322

323

324

325

326



327 **Figura 3 - Esquema do cisto de *Giardia intestinalis*.** Principais estruturas do cisto.  
 328 Nota-se neste esquema a parede cística, quatro núcleos e flagelos internalizados.  
 329 Fonte: Midlej, 2016, adaptado.

330

### 331 1.6. Morfologia do Trofozoíto

332

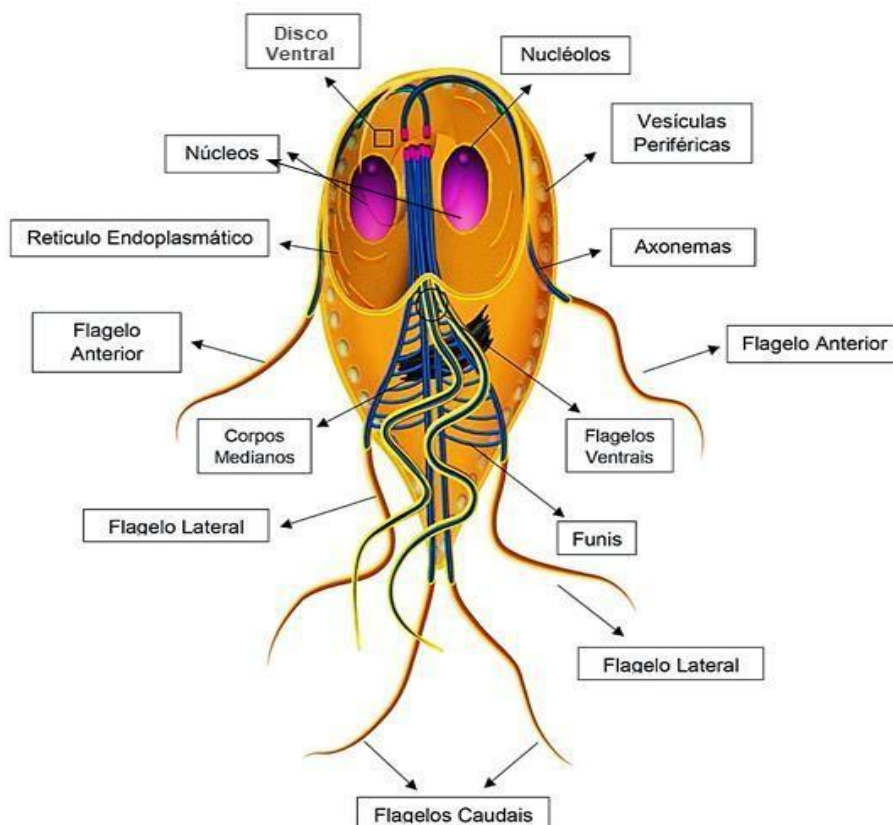
333 O trofozoíto de *G. intestinalis* é binucleado, medindo  
 334 aproximadamente 12 a 15  $\mu\text{m}$  de comprimento entre as extremidades  
 335 anterior e posterior (**FIG. 4**). Apresenta uma porção anterior mais larga e  
 336 uma porção caudal cônica, conferindo-lhe um formato que se assemelha a  
 337 uma pera cortada ou a uma gota. Além dos dois núcleos, possui quatro  
 338 pares de flagelos (anteriores, caudais, póstero-laterais e ventrais), um  
 339 disco ventral, corpo mediano, funis e uma flange ventro-lateral. Seu  
 340 citoesqueleto é composto principalmente por microtúbulos e outras  
 341 proteínas como a giardina, conferindo suporte estrutural e mobilidade ao  
 342 parasito (NOSALA *et al.*, 2018; GADELHA *et al.*, 2019; KIM & PARK, 2019).

343

344 O parasito apresenta um conjunto de vesículas conhecidas como  
 vesículas periféricas, além de uma rede de retículo endoplasmático

345 altamente desenvolvida. Ambos os núcleos possuem um complexo de  
346 membranas nucleares semelhante ao observado em células eucarióticas  
347 superiores. Durante o processo de diferenciação de trofozoítos em cistos,  
348 surgem dois tipos adicionais de vesículas: vesículas específicas de  
349 encistamento (ESVs – *Specific Encystment Vesicles*) e vesículas positivas  
350 para carboidratos (ECVs – *Encystment Carbohydrate Vesicles*), que  
351 desempenham papel fundamental na formação da parede do cisto  
352 (MIDDLEJ *et al.*, 2017). Apresenta também ribossomos e grânulos de  
353 glicogênio dispersos no citoplasma. Embora *G. intestinalis* não possua  
354 mitocôndrias típicas, possui uma organela denominada mitossomo, que  
355 corresponde às mitocôndrias vestigiais, formas altamente reduzidas que  
356 não contêm nenhum genoma e perderam a capacidade de gerar energia.  
357 (TOVAR *et al.*, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2004). No entanto, essas  
358 organelas preservaram algumas características típicas das mitocôndrias,  
359 como a presença de uma membrana dupla, a síntese de aglomerados de  
360 ferro-enxofre (FeS) e a necessidade de sinais de translocação para a  
361 importação de proteínas mitossomais (EINARSSON *et al.*, 2016). Ainda  
362 persiste um considerável debate sobre a presença do complexo de Golgi  
363 em *G. intestinalis*, uma vez que alguns pesquisadores sugerem que as  
364 ESVs desempenhariam uma função biológica análoga à do complexo de  
365 Golgi, enquanto outros defendem que este parasito não possui tal  
366 organela (MIDDLEJ *et al.*, 2017; KIM & PARK, 2019).

367



368

369 **Figura 4- Esquema do trofozoítio de *Giardia intestinalis*.** As principais estruturas do  
 370 trofozoítio são mostradas. Neste diagrama, destacam-se os flagelos, o corpo mediano,  
 371 os dois núcleos e as vesículas periféricas do trofozoítio. Fonte: M. Benchimol, 2022,  
 372 adaptado.

373

### 374 1.6.1. Núcleos e nucléolos

375 O parasito é binucleado (**Fig. 4**), com seus núcleos apresentando uma  
 376 aparência quase idêntica. Estes núcleos estão simetricamente posicionados na  
 377 porção anterior da célula, possuindo formatos esférico ou oval e sendo envoltos  
 378 por uma membrana nuclear. Ambos os núcleos contêm a mesma quantidade de  
 379 cromossomos e apresentam homologia nas sequências de nucleotídeos,  
 380 embora não sejam completamente idênticos, podendo variar quanto à fase do  
 381 ciclo celular em que se encontram e número e distribuição de poros nucleares  
 382 (BENCHIMOL, 2005).

383 Os trofozoítos de *G. intestinalis* possuem cinco cromossomos, cujos  
 384 tamanhos variam de 1,6 a 3,8 Mb. Cada núcleo apresenta uma organização  
 385 genômica diploide, o que confere ao parasito um conteúdo tetraploide (LE  
 386 BLANCQ & ADAM, 1998; BERNANDER *et al.*, 2001). Os núcleos de *G.*

387 *intestinalis* são envoltos por duas membranas, que constituem o envelope  
388 nuclear. A membrana externa, contínua com a membrana do retículo  
389 endoplasmático, contém poros nucleares e apresenta ribossomos, os quais  
390 estão envolvidos na síntese de proteínas. A membrana nuclear interna é  
391 composta por proteínas filamentosas, que formam a lâmina nuclear  
392 (BENCHIMOL, 2005; NOHYNKOVA, 2000; JIRÁKOVÁ *et al.*, 2012).

393 A hipótese inicial de que *G. intestinalis* não possuía nucléolo foi refutada  
394 por vários estudos de biologia celular, que forneceram evidências crescentes da  
395 existência de um pequeno nucléolo localizado na região anterior de cada um  
396 dos núcleos deste parasito (GAONA-LÓPEZ *et al.*, 2023). Com um diâmetro  
397 aproximado de 0,2-0,5 µm, os nucléolos de *G. intestinalis* podem apresentar  
398 aumento de tamanho durante o crescimento celular e a síntese de proteínas, o  
399 que dificulta seu isolamento em alta qualidade e quantidade (JIMENEZ-GARCIA  
400 *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2020). Em *G. intestinalis*, foram  
401 observados elementos nucleolares persistindo na periferia nuclear durante  
402 todas as fases da divisão, incluindo a telófase. Esse fenômeno sugere que a  
403 montagem e desmontagem do nucléolo não ocorrem de forma típica nesse  
404 organismo ou, ao menos, não são tão evidentes quanto em outros eucariotos  
405 (LARA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016). O papel dos nucléolos está associado à síntese  
406 de ribossomos e à formação do RNA ribossomal, variando conforme a fase do  
407 ciclo celular em que o parasito se encontra. O nucléolo se origina no  
408 nucleoplasma como uma estrutura redonda ou oval e é deslocado para a  
409 margem do envoltório nuclear, onde os componentes ribossomais são liberados  
410 no citoplasma (JIMENEZ-GARCIA *et al.*, 2008; TIAN *et al.*, 2010).

411

### 412 1.6.2. Mitossomos

413 *G. intestinalis* não possui mitocôndrias típicas, conhecidas pela  
414 produção de ATP utilizando o oxigênio como acceptor de elétrons. Em ambientes  
415 com baixos níveis de oxigênio, a mitocôndria pode apresentar adaptações  
416 significativas em sua estrutura e dinâmica para compensar essa deficiência,  
417 originando organelas denominadas genericamente de MROs (*Mitochondrion-*  
418 *Related Organelles*), ou organelas relacionadas à mitocôndria, cujo nome varia  
419 de acordo com o organismo em questão. No caso de *G. intestinalis*, a MRO é  
420 chamada de mitossomo. Esta organela não está diretamente envolvida no  
421 metabolismo energético, embora alguns estudos sugiram a ocorrência de  
422 transporte de elétrons no mitossomo de *G. intestinalis* (MAKIUCHI & NOZAKI,  
423 2014).

424 Os mitossomos de *G. intestinalis* estão localizados entre os dois núcleos  
425 e os axonemas dos flagelos (designados como mitossomos centrais) e também  
426 se distribuem por todo o citoplasma (mitossomos periféricos) (TOVAR *et al.*,  
427 2003; JEDELSKÝ *et al.*, 2011). Essas organelas não desempenham funções  
428 típicas das mitocôndrias, como a participação no ciclo do ácido cítrico ou na  
429 síntese de ATP. A presença de DNA nos mitossomos também não foi detectada  
430 (TOVAR *et al.*, 2003). A principal função observada nos mitossomos de *G.*  
431 *intestinalis* envolve a biossíntese de complexos ferro-enxofre e o sistema de  
432 importação de proteínas TIM e TOM. Além disso, essas organelas contêm  
433 proteínas como Cpn60, HSP70 e ferredoxina, associadas com a manutenção da  
434 integridade estrutural e na facilitação de reações metabólicas (TOVAR *et al.*,  
435 2003; REGOES *et al.*, 2005; JEDELSKÝ *et al.*, 2011; ROUT *et al.*, 2016).

### 436 1.6.3. Retículo Endoplasmático

437 O retículo endoplasmático (FIG. 4) da *G. intestinalis* é evidenciado por  
438 microscopia eletrônica de transmissão, associada à imunolocalização de  
439 proteínas características dessa organela (SOLTYS *et al.*, 1996). Embora  
440 apresente um tráfego secretório convencional, alguns mecanismos, como as  
441 modificações pós-traducionais e o controle das proteínas secretadas por  
442 glicosilação do tipo N, não foram completamente identificados. Estes processos  
443 requerem diversos transportadores de açúcares e nucleotídeos, sendo que a

444 glicosilação é limitada (WAMPFLER *et al.*, 2014; ZAMPONI *et al.*, 2017). Em  
445 estudo utilizando tomografia eletrônica, Abodeely *et al.* (2009) sugeriram que o  
446 retículo endoplasmático de *G. intestinalis* forma uma rede tubovesicular de  
447 endomembranas, desempenhando funções associadas a endossomos e  
448 lisossomos. Dessa forma, o retículo endoplasmático do parasito se configura  
449 como uma organela multifuncional, atuando na síntese de proteínas, endocitose  
450 e degradação de material proveniente do meio extracelular (ABODEELY *et al.*,  
451 2009).

#### 452 **1.6.4. Vesículas Periféricas (VPs)**

453 As vesículas periféricas (**FIG. 4**) consistem em um conjunto de vacúolos  
454 de aproximadamente 150 nm, localizadas sob a membrana plasmática. Essas  
455 vesículas fazem parte do sistema endossomal-lisossomal de *G. intestinalis* ,  
456 devido a várias características, como sua natureza ácida, a presença de  
457 atividade hidrolítica e a capacidade de absorver partículas ou moléculas  
458 exógenas. A localização da glicose-6-fosfatase e de proteínas contendo  
459 ligações dissulfeto (SH) nessas organelas, juntamente com a observação, por  
460 microscopia eletrônica, de uma conexão entre as vesículas periféricas e o  
461 retículo endoplasmático, sugerem uma interação entre esses componentes  
462 (LANFREDI-RANGEL *et al.*, 1998).

463 Além disso, as vesículas periféricas estão envolvidas no sistema  
464 exocítico do parasito (MOYANO *et al.*, 2019). Vesículas intraluminais  
465 observadas dentro das vesículas periféricas apresentam características  
466 morfológicas de corpos multivesiculares e seriam secretadas durante o  
467 processo de diferenciação (MIDDLEJ *et al.*, 2019).

468

#### 469 **1.6.5. Microtúbulos**

470 Comparados as estruturas do citoesqueleto evolutivamente conservadas  
471 e amplamente estudadas, como o fuso mitótico ou o flagelo, algumas estruturas  
472 microtubulares exclusivas de *G. intestinalis* apresentam a capacidade de formar  
473 polímeros simples, gerando arranjos com diversas formas e funções (CHAABAN  
474 & BROUHARD, 2017). Os trofozoítos de *G. intestinalis* apresentam organelas

475 microtubulares de notável dinamicidade e estabilidade, entre as quais se  
476 destacam o disco ventral, os oito flagelos, o corpo mediano e os funis (HAGEN  
477 *et al.*, 2020)

#### 478 **1.6.5.1. Flagelos**

479 A capacidade do trofozoíto de interagir com as células intestinais está  
480 estreitamente relacionada a uma regulação de seu citoesqueleto, tanto pela  
481 adesão ao epitélio quanto pelo controle de seu movimento impulsionado pelos  
482 flagelos. O parasito possui oito flagelos (**FIG. 4**), dispostos em pares e  
483 nomeados conforme sua localização: flagelos anteriores, laterais posteriores,  
484 ventrais e caudais (MCNALLY & DAWSON, 2016). A estrutura dos axonemas  
485 de *G. intestinalis* segue o arranjo típico observado na maioria dos flagelos  
486 eucarióticos (9:2+2), sendo esses axonemas responsáveis pelos diferentes  
487 tipos de movimento do trofozoíto. Os axonemas se originam da região dos  
488 corpúsculos basais (**FIG. 4**), localizados internamente na célula entre os dois  
489 núcleos. Os flagelos desempenham um papel crucial na motilidade, no processo  
490 de encistamento/desencistamento, na adesão às células do hospedeiro e na  
491 divisão celular (NOSALA & DAWSON, 2015). Durante a mitose, acredita-se que  
492 a associação dos microtúbulos dos corpúsculos basais aos polos do fuso seja  
493 responsável por determinar a polaridade de cada célula filha (KIM & PARK,  
494 2019; GADELHA *et al.*, 2019).

495 Uma característica peculiar dos flagelos de *G. intestinalis* é o fato de que  
496 os axonemas percorrem longas distâncias no citoplasma antes de emergirem  
497 como flagelos ativos. Estruturas acessórias estão ligadas a todas as porções  
498 intracelulares dos axonemas. Essas estruturas incluem, por exemplo, placas  
499 marginais, bastões densos, bastões paraxiais e funis (MAIA-BRIGAGÃO,  
500 GADELHA & DE SOUZA, 2013). A região de externalização dos flagelos,  
501 denominada poro flagelar, foi caracterizada por nosso grupo recentemente,  
502 sendo descrita a presença uma nova estrutura extra-axonemal (VERDAN *et al.*,  
503 2024).

504 Além da tubulina, outros tipos de proteínas estão presentes nos flagelos  
505 de *G. intestinalis*. Destacam-se as  $\alpha$ -giardinas, que apresentam homologia com  
506 as anexinas humanas e possuem a capacidade de se ligar a fosfolipídios de

507 maneira dependente de cálcio (VAHRMANN *et al.*, 2008). O papel funcional  
508 dessas proteínas ainda não está totalmente esclarecido. Pathuri *et al.* (2009)  
509 sugeriram que a  $\alpha$ -14 giardina poderia estar envolvida na desmontagem e  
510 montagem dos flagelos durante a diferenciação do parasito. A  $\gamma$ -tubulina e a  
511 centrina, encontradas nos corpúsculos basais dos flagelos, indicam que essa  
512 região pode atuar como um centro organizador de microtúbulos (GADELHA *et*  
513 *al.*, 2019).

#### 514 **1.6.5.2. Disco ventral**

515 O disco ventral é uma estrutura característica do trofozoíto, cobrindo  
516 praticamente toda a face ventral da célula. Apresenta uma rigidez aparente e  
517 uma forma de ferradura, com uma extremidade contendo uma densa estrutura  
518 fibrosa conhecida como crista lateral (CARVALHO & MONTEIRO, 2004). O  
519 disco ventral é considerado, ao menos em parte, responsável pela adesão do  
520 parasito às células do hospedeiro (HOLBERTON, 1973; HOUSE *et al.*, 2011). O  
521 citoesqueleto do disco ventral é composto por uma camada espiralada de  
522 microtúbulos dispostos no sentido horário (**FIG. 5**). As microfitas, que são  
523 estruturas fibrosas com arranjo trilaminar compostas por giardinas, interagem  
524 perpendicularmente com os microtúbulos ao longo de toda a sua extensão. As  
525 pontes proteicas, denominadas *crossbridges*, conectam as microfitas entre si  
526 (GADELHA *et al.*, 2019; KIM & PARK, 2019).

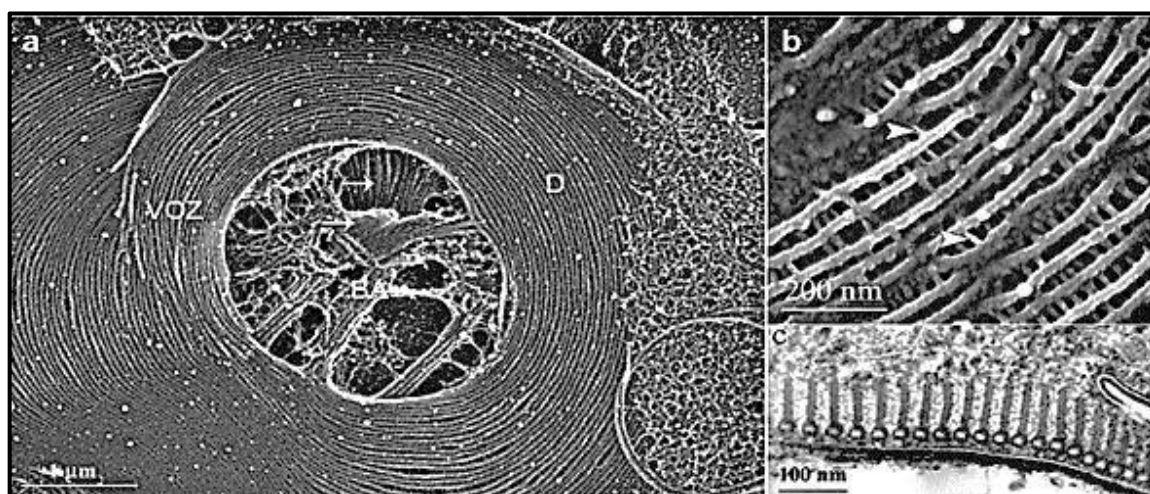
527 As tubulinas são as principais proteínas identificadas nas análises  
528 proteômicas do citoesqueleto do disco (LOURENÇO *et al.*, 2012; HAGEN *et al.*,  
529 2011). Estas proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais, como  
530 acetilação e poliglicilação (SOLTYS & GUPTA, 1994; CAMPANATI *et al.*, 1999;  
531 GADELHA *et al.*, 2022). Outra proteína abundante no disco é a giardina, um dos  
532 principais componentes das microfitas, exclusiva de *G. intestinalis*.

533 As funções desempenhadas pelo disco ventral e sua interação com  
534 outras estruturas ainda não é bem descrito. Uma das hipóteses levantadas  
535 sugere que a flange ventro-lateral, uma projeção da membrana plasmática  
536 localizada na periferia do corpo do parasito, desempenha um papel crucial na  
537 adesão de *G. intestinalis* ao epitélio intestinal, funcionando como um  
538 mecanismo de vedação que consolida a interação parasito-hospedeiro (HAGEN

539 *et al.*, 2011). Essa hipótese propõe um menor protagonismo do disco ventral na  
 540 adesão, divergindo de estudos anteriores que atribuíam a ele um papel central  
 541 nesse processo (HOLBERTON, 1973). Outra possível função atribuída ao disco  
 542 ventral está relacionada à cariocinese, onde sua estrutura poderia atuar  
 543 comprimindo o envelope nuclear, contribuindo para a divisão celular  
 544 (BENCHIMOL, 2004b).

545 Durante o encistamento, o disco ventral passa por alterações estruturais  
 546 significativas (TŮMOVÁ *et al.*, 2007). No estágio inicial desse processo, o disco  
 547 mantém sua conformação característica em forma de ferradura (BENCHIMOL,  
 548 2004b). Contudo, estudos demonstraram que, à medida que o encistamento  
 549 progride, a maioria das células perde gradativamente sua capacidade de  
 550 adesão. Com o avanço desse processo, foi observado que o disco ventral se  
 551 fragmenta, resultando em quatro partes distintas que podem ser identificadas no  
 552 interior do cisto (ERLANDSEN *et al.*, 1989; SHEFFIELD & BJORVAT, 1977). Na  
 553 fase final da mitose, o disco ventral da célula-mãe perde sua organização  
 554 estrutural, resultando no desarranjo de seus microtúbulos e pontes, o que  
 555 contribui para o desprendimento da célula do substrato. Importa destacar que,  
 556 durante esse processo, não foi observada a despolimerização dos microtúbulos  
 557 (TŮMOVÁ *et al.*, 2007).

558



559 **Figura 5: Microscopia eletrônica do citoesqueleto de *G. intestinalis*.** (a)  
 560 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução onde se observa a espiral de  
 561 microtúbulos que forma o disco ventral (D). A zona de sobreposição ventral (VOZ:  
 562 “ventral overlap zone”) e a área nua (BA: “bare area”) podem ser observadas. (b) Maior

563 aumento demonstrando o complexo microtúbulos/microfitas e as *crossbridges* (cabeças  
564 de seta). (c) Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando um corte transversal  
565 do disco ventral evidenciando as microfitas (Gadelha *et al.*, 2017).

566

### 567 **1.6.5.3. Funis**

568 Os funis (**FIG. 4**) são estruturas compostas por duas camadas  
569 longitudinais de microtúbulos que envolvem parcialmente os flagelos caudais.  
570 Essas estruturas têm origem em fibras densas localizadas próximas aos  
571 corpúsculos basais. Na porção caudal da célula, microtúbulos individuais se  
572 projetam de cada camada e se espalham lateralmente, dirigindo-se aos  
573 axonemas dos flagelos posterior-laterais ou à membrana plasmática. Nos funis,  
574 os microtúbulos são conectados por pontes e recobertos por um material  
575 indefinido. Embora ainda seja um ponto de debate, acredita-se que os funis  
576 desempenhem um papel na movimentação da região caudal de *G. intestinalis*  
577 (BENCHIMOL *et al.*, 2004).

578

### 579 **1.6.5.4. Corpo Mediano**

580 O corpo mediano (**FIG. 4**) localiza-se no citoplasma, posterior aos  
581 núcleos (ELMENDORF *et al.*, 2003), e é disposto paralelamente ao axonema  
582 dos flagelos caudais (DAWSON, 2010). Sua forma assemelha-se a uma vírgula  
583 e é constituído por um conjunto de microtúbulos organizados em camadas  
584 (PIVA & BENCHIMOL, 2004). O corpo mediano apresenta espessura entre 0,2  
585 e 1,8  $\mu\text{m}$  e comprimento de 0,8 a 8,0  $\mu\text{m}$ , com sua posição podendo variar  
586 dentro da célula (PIVA & BENCHIMOL, 2004). Embora seu papel ainda não  
587 tenha sido completamente esclarecido, supõe-se que ele funcione como uma  
588 reserva de tubulina pré-polimerizada para a formação do disco ou como um  
589 centro organizador de microtúbulos (DAWSON, 2010).

590

## 591 **1.7. Tratamento**

592 O tratamento da giardíase baseia-se na administração de fármacos  
593 classificados em diversas categorias, destacando-se os benzimidazóis e os 5-

594 nitroimidazóis como as classes mais relevantes, uma vez que originaram os  
595 compostos comumente empregados no tratamento da doença. Nesse contexto,  
596 a nitazoxanida, um composto de nitrotiazolil benzamida, destaca-se como um  
597 medicamento antiparasitário relativamente recente e de amplo espectro, com  
598 eficácia comprovada no tratamento de infecções causadas por protozoários e  
599 helmintos. Mais recentemente, esse antibiótico nitrotiazólico foi indicado como  
600 uma opção terapêutica para o tratamento da giardíase (ESCOBEDO *et al.*,  
601 2008).

602 O metronidazol (MTZ), pertencente à classe dos 5-nitroimidazóis, é o  
603 tratamento de primeira linha para diversas infecções causadas por patógenos  
604 anaeróbicos, incluindo *G. intestinalis*. Este medicamento é administrado duas a  
605 três vezes ao dia, por um período de até sete dias. Apesar de apresentar uma  
606 eficácia que varia entre 73% e 100%, o aumento da resistência clínica e os  
607 múltiplos efeitos colaterais comprometem sua efetividade, resultando em falhas  
608 no tratamento (EMERY *et al.*, 2018; MULLER *et al.*, 2018; SAGHAUG *et al.*,  
609 2019). O mecanismo de ação do metronidazol ocorre após sua ativação nas  
610 vias metabólicas anaeróbicas da *G. intestinalis*. O composto penetra no parasito  
611 por difusão passiva e é ativado por meio de uma redução enzimática, mediada  
612 pelas enzimas piruvato-ferredoxina oxidoreductase, nitroreductase 1 e tioredoxina  
613 reductase (SAGHAUG *et al.*, 2019). Após essa redução, o grupo 5-nitro do  
614 metronidazol gera radicais ânions nitro e outros compostos, como derivados  
615 nitroso e hidroxilamina, que interagem com o DNA, danificando-o e interferindo  
616 na sua duplicação (SAGHAUG *et al.*, 2019). Como consequência, ocorrem  
617 alterações no ciclo celular do parasito, com o acúmulo de células na fase S  
618 (SAGHAUG *et al.*, 2019). Além disso, os trofozoítos tratados com metronidazol  
619 apresentam um aumento nas vesículas periféricas e formas semelhantes à  
620 mielina (SAGHAUG *et al.*, 2019).

621 Embora o metronidazol seja um composto eficaz e amplamente utilizado  
622 no tratamento da giardíase, já foram relatadas algumas consequências  
623 adversas decorrentes de seu uso prolongado. O primeiro efeito negativo  
624 associado ao metronidazol refere-se aos seus efeitos colaterais, que incluem  
625 dor de cabeça, vertigem, náuseas e gosto metálico na boca. Entre os efeitos  
626 mais raros, destacam-se a pancreatite e a toxicidade no sistema nervoso central

627 (KIM *et al.*, 2004). De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA),  
628 agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos, o metronidazol  
629 demonstra atividade carcinogênica em ratos e camundongos. Além disso, a  
630 utilização prolongada de nitrocompostos, que já são empregados na prática  
631 clínica há mais de 50 anos, tem favorecido a seleção de parasitos resistentes.

632 O segundo fármaco mais utilizado no tratamento da giardíase é o  
633 albendazol, um benzimidazol que pode ser administrado em dose única por até  
634 sete dias. Entre seus efeitos colaterais, estão náuseas, vômitos, diarreia e dor  
635 abdominal (BENCHIMOL *et al.*, 2022). Sua eficácia varia entre 35% e 96%,  
636 sendo mais alta quando combinado com outros fármacos. O FDA recomenda  
637 precaução no uso deste medicamento em mulheres em idade fértil, devido ao  
638 seu potencial teratogênico. Os compostos da classe benzimidazólica agem no  
639 citoesqueleto de  $\beta$ -tubulina do parasito, inibindo sua polimerização e  
640 prejudicando a captação de glicose. O albendazol se liga à  $\beta$ -tubulina,  
641 impedindo sua polimerização nos microtúbulos. Isso resulta no rompimento do  
642 disco ventral, fazendo com que o trofozoíto se descole do substrato. Além disso,  
643 o albendazol induz o acúmulo de células na fase G2, provavelmente ao interferir  
644 na formação do fuso mitótico do parasito. No entanto, apesar de afetar os  
645 microtúbulos do disco ventral, esse composto não prejudica os microtúbulos do  
646 axonema ou do corpo mediano (BENCHIMOL *et al.*, 2022).

647 A nitazoxanida, por sua vez, é administrada três vezes ao dia e está  
648 associada a efeitos adversos, como cefaleia e distúrbios gastrointestinais.  
649 Contudo, apresenta taxas de cura entre 70% e 80%. Dois mecanismos de  
650 ação têm sido propostos para este composto: (1) a inibição de enzimas do  
651 parasita, como a ferredoxina oxidorreductase e a nitroreductase G1NR1, ou (2)  
652 a geração de ânions radicais nitro pela redução do grupo 5-nitro presente na  
653 molécula (MÜLLER *et al.*, 2007). Ensaios *in vitro* demonstraram que, após  
654 exposição à nitazoxanida ou ao híbrido N-metil-1H-benzimidazol CMC-20,  
655 ocorreram ruptura da membrana plasmática do parasita e danos ao disco  
656 ventral (MATADAMASMARTÍNEZ *et al.*, 2016). Adicionalmente, estudos  
657 recentes revelaram que a nitazoxanida e o metronidazol promoveram  
658 alterações na microbiota intestinal em modelos experimentais de ratos e

659 camundongos. Essas alterações podem estar associadas tanto à eficácia do  
660 tratamento quanto ao prolongamento da infecção (BENCHIMOL *et al.*, 2022).

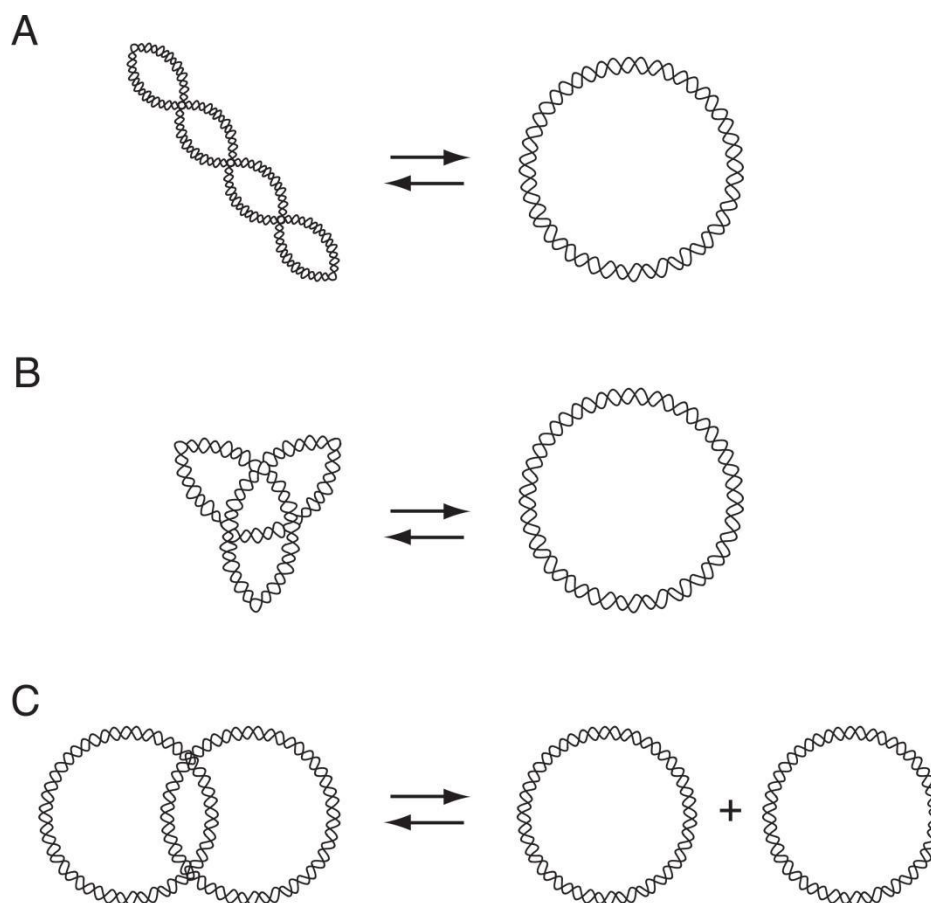
661

## 662 **1.8. Alvos quimioterápicos dos inibidores das topoisomerases**

663 As topoisomerases de DNA são enzimas vitais que atuam resolvendo  
664 problemas topológicos do DNA que resultam da separação de fitas durante a  
665 replicação e transcrição (POMMIER *et al.*, 2016). São amplamente distribuídas  
666 e essenciais, desempenhando papéis cruciais em processos biológicos  
667 fundamentais, como replicação, transcrição, recombinação, reparo e  
668 remodelação da cromatina (CHEN *et al.*, 2013). As topoisomerases de DNA são  
669 classificadas em duas categorias principais: tipo I e tipo II. As enzimas do tipo I  
670 quebram transitoriamente uma única fita de DNA de cada vez, enquanto as  
671 enzimas do tipo II, por sua vez, quebram temporariamente ambos os pares de  
672 fitas em uma dupla hélice de DNA, atuando como moléculas de enzimas  
673 diméricas (**FIG. 6**). Assim, as topoisomerases do tipo I apresentam uma  
674 capacidade de relaxamento da estrutura do DNA menos acentuada em  
675 comparação às do tipo II (SUN *et al.*, 2020). Ambas as categorias podem ser  
676 subdivididas em quatro subfamílias: IA, IB, IIA e IIB. Os membros de uma  
677 mesma subfamília apresentam semelhanças estruturais e mecânicas, enquanto  
678 as enzimas de subfamílias diferentes são distintas entre si (WANG, 2002).

679 As topoisomerases do tipo II são ativadas em regiões cromossômicas  
680 onde duas duplas-hélices de DNA se entrecruzam. Ao se ligar a um desses  
681 pontos de interseção, a topoisomerase II inicia um ciclo de reações favorecido  
682 pela hidrólise do ATP, incluindo: (1) clivagem reversível de uma das duplas-  
683 hélices, formando uma abertura na estrutura do DNA; (2) transposição da  
684 segunda dupla-hélice adjacente através dessa abertura; e (3) religação das  
685 cadeias rompidas e subsequente liberação do DNA. Esse mecanismo permite  
686 que as topoisomerases do tipo II atuem de forma eficiente na separação de  
687 moléculas de DNA topologicamente interligadas, como ocorre na resolução de  
688 círculos de DNA entrelaçados (ALBERTS *et al.*, 2010).

689



690

691 **Figura 6: Reações catalisadas por DNA topoisomerasas. (a)** Tanto as  
 692 topoisomerasas do tipo I quanto as do tipo II possuem a habilidade de relaxar o DNA  
 693 superenrolado. **(b)** As topoisomerasas do tipo II, em particular, são capazes de  
 694 catalisar o entrelaçamento e o desenlace de DNA de fita dupla intacta **(c)** bem como a  
 695 catenação e a decatenação de moléculas de DNA também de fita dupla e  
 696 estruturalmente contínuas. Fonte : NITISS *et al.*, 2021.

697

698 Todos os organismos vivos possuem a capacidade de codificar ao menos  
 699 uma topoisomerase de cada tipo, I e II. Enquanto organismos eucariotos  
 700 inferiores sintetizam uma única enzima do tipo II, os vertebrados expressam  
 701 duas isoformas dessa enzima, denominadas topoisomerase II $\alpha$  e II $\beta$ . No  
 702 genoma humano, essas isoformas são codificadas por genes distintos,  
 703 localizados nos cromossomos 17q21–22 e 3p24, respectivamente, e  
 704 apresentam massas moleculares de 170 kDa e 180 kDa. Apesar de  
 705 compartilharem aproximadamente 70% de identidade em sua sequência e  
 706 possuírem propriedades enzimáticas análogas, essas isoformas diferem  
 707 significativamente em seus padrões de expressão, sugerindo funções biológicas  
 708 específicas (VANN *et al.*, 2021).

709 A expressão da topoisomerase II $\alpha$  está estreitamente associada ao  
710 processo de crescimento celular, sendo essencial para a viabilidade de células  
711 em proliferação, atingindo seu nível máximo nas fases G<sub>2</sub> e M do ciclo celular.  
712 Essa isoforma está diretamente envolvida na dinâmica das forquilhas de  
713 replicação e mantém uma forte interação com os cromossomos ao longo da  
714 mitose. Além disso, a enzima desempenha funções relevantes na transcrição e  
715 recombinação do DNA, contribuindo para a convergência das forquilhas e a  
716 finalização da replicação. Dessa forma, sua atividade é indispensável para a  
717 correta organização e segregação dos cromossomos. Em contraste, a isoforma  
718  $\beta$  não se faz imprescindível para a sobrevivência celular, apresentando níveis  
719 elevados de expressão na maioria dos tipos celulares, independentemente do  
720 estado proliferativo. Diferentemente da topoisomerase II $\alpha$ , a isoforma II $\beta$   
721 dissocia-se dos cromossomos durante a mitose, porém desempenha um papel  
722 fundamental na regulação da transcrição de genes sob controle hormonal  
723 (VANN *et al.*, 2021).

724

### 725 **1.9. Inibidores de topoisomerase e reposicionamento de fármacos**

726 As DNA topoisomerases representam alvos terapêuticos promissores  
727 para o desenvolvimento de novos fármacos. Diversos inibidores dessas  
728 enzimas foram concebidos com base em seus diferentes subtipos, uma vez que  
729 desempenham um papel crucial na quimioterapia, especialmente no tratamento  
730 de neoplasias. Os inibidores da topoisomerase I, como a camptotecina,  
731 promovem a formação de um complexo ternário, aprisionando a enzima em  
732 associação com o DNA. Por outro lado, os inibidores da topoisomerase II,  
733 majoritariamente representados por compostos como a mitoxantrona e o  
734 etoposídeo, impedem a religação da dupla fita do DNA, interferindo na  
735 progressão celular. Ademais, certos inibidores apresentam propriedades  
736 híbridas, atuando simultaneamente sobre ambas as isoformas da enzima,  
737 topoisomerase I e II, sendo por isso denominados inibidores duplos (BUZUN *et*  
738 *al.*, 2020).

739 A DNA girase é essencial para a sobrevivência de bactérias, mas está  
740 amplamente ausente em eucariotos e, portanto, é um alvo ideal para

741 medicamentos. As quinolonas representam a classe terapêutica mais relevante  
742 de inibidores da DNA girase, sendo amplamente empregadas no tratamento de  
743 diversas infecções. Tradicionalmente, essas substâncias foram classificadas em  
744 duas categorias principais: as quinolonas ácidas de gerações iniciais, como o  
745 ácido nalidíxico, eficazes contra bactérias gram-negativas, e as fluoroquinolonas  
746 anforóticas, como a ciprofloxacina (BUSH *et al.*, 2015). Estudos demonstraram  
747 que as quinolonas interferem no superenrolamento e no relaxamento do DNA  
748 ao se ligarem simultaneamente à girase e ao DNA, estabilizando a formação do  
749 complexo de clivagem girase-DNA. A interrupção da síntese de DNA promovida  
750 por esses fármacos não decorre diretamente da inibição da atividade da girase,  
751 mas sim da formação desse complexo ternário, que impede a progressão da  
752 maquinaria replicativa, resultando na interrupção do crescimento celular. Esse  
753 mecanismo sugere que a ação bacteriostática das quinolonas decorre dessa  
754 inibição da replicação. Já a morte celular parece estar associada a quebras  
755 irreparáveis no DNA, que ocorrem como uma segunda etapa do processo e  
756 podem ser mediadas tanto por vias dependentes quanto independentes da  
757 síntese proteica (BUSH *et al.*, 2015).

758 O reposicionamento de fármacos, definido como a busca por novas  
759 indicações terapêuticas para medicamentos já aprovados ou em estágios  
760 avançados de desenvolvimento, tem se revelado uma estratégia promissora na  
761 identificação de tratamentos para diversas patologias. Uma vantagem  
762 significativa desse método é que os desafios relacionados à produção e  
763 formulação desses fármacos já são amplamente conhecidos, tornando o  
764 reposicionamento uma alternativa estratégica em relação ao desenvolvimento  
765 de novas moléculas. A reutilização de ativos farmacêuticos permite minimizar  
766 riscos, reduzir custos e encurtar o tempo necessário para que os medicamentos  
767 alcancem o mercado. Essa abordagem se mostra particularmente relevante  
768 para Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), uma área frequentemente  
769 impactada pela escassez de recursos e pela limitada disponibilidade de terapias  
770 eficazes (FERREIRA & ANDRICOPULO, 2016).

771 O reposicionamento de fármacos é uma estratégia utilizada na  
772 quimioterapia antiparasitária, incluindo o tratamento para a giardíase. Estudos  
773 recentes avaliaram os efeitos citotóxicos da terfenadina, um anti-histamínico da

774 classe das piperidinas, como um fármaco reposicionado para o tratamento da  
775 giardíase, demonstrando que o fármaco inibe o crescimento e a viabilidade  
776 celular de forma dependente da dose e do tempo de exposição; os achados  
777 sugerem que a terfenadina é uma candidata promissora ao reposicionamento  
778 para o tratamento da giardíase (SUÁREZ-RICO *et al.*, 2023). Um outro estudo  
779 mostrou que o omeprazol, um inibidor da bomba de prótons, exerce efeito tóxico  
780 sobre *G. intestinalis* ao inibir a triosefosfato isomerase (GITIM), uma enzima  
781 essencial para o metabolismo energético do parasito, sendo então um candidato  
782 promissor para o reposicionamento no tratamento da giardíase, pois apresenta  
783 eficácia comparável à de fármacos tradicionais, além de possuir um perfil de  
784 segurança já bem estabelecido (LÓPEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2019).

785 No que tange às topoisomerases II, o reposicionamento de inibidores  
786 também tem sido investigado no tratamento de doenças infecciosas  
787 negligenciadas, como a tripanossomíase africana humana (DIAS, 2014). A  
788 necessidade de novas opções terapêuticas eficazes contra essas doenças  
789 impulsiona a exploração de fármacos existentes, visando ampliar o arsenal  
790 terapêutico disponível. Em síntese, o reposicionamento de fármacos constitui  
791 uma estratégia eficaz e econômica na descoberta de novas terapias, sendo  
792 especialmente relevante em contextos de emergência sanitária e para doenças  
793 que necessitam de tratamentos eficazes. A sua aplicação contínua pode  
794 acelerar a disponibilização de medicamentos seguros e eficazes para diversas  
795 condições clínicas.

796

#### 797 **1.10. *Giardia intestinalis* e as topoisomerases**

798 Uma topoisomerase II (GITop 2) foi identificada no genoma de *G.*  
799 *intestinalis*. GITop 2 apresenta uma identidade de sequência de 31,7% e 32%  
800 em relação às suas homólogas humanas, Top 2 $\alpha$  e Top 2 $\beta$ , respectivamente.  
801 Contudo, foram identificadas certas discrepâncias estruturais, incluindo seis  
802 inserções localizadas no domínio ATPase e no domínio central, com  
803 aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos mais extenso, bem como um  
804 domínio C-terminal cerca de 200 resíduos mais curto, caracterizado pela  
805 presença de resíduos carregados. Essas particularidades, evidenciadas pela

806 comparação com a topoisomerase II humana, podem contribuir para a  
807 investigação da seletividade de fármacos com potencial aplicação na terapia  
808 contra a giardíase (HE *et al.*, 2005).

809 Durante o processo de encistamento, o trofozoíto pode se diferenciar em  
810 cisto por meio da divisão de dois núcleos e da replicação do DNA, resultando  
811 em um cisto com quatro núcleos. Os níveis de topoisomerase II aumentam  
812 durante esse processo (LIN *et al.*, 2013). Além disso, a formação de cistos e a  
813 expressão dos genes CWP1-3 e myb2 são exacerbadas pela superexpressão  
814 de topoisomerase II, sugerindo que essa enzima desempenha um papel crucial  
815 na ativação e expressão desses genes, bem como no encistamento de *G.*  
816 *intestinalis* (LIN *et al.*, 2017).

817 Estudos recentes também identificaram e caracterizaram uma  
818 topoisomerase do tipo IA (TOP3 $\beta$ ) em *G. intestinalis*, a qual apresenta  
819 semelhanças com a topoisomerase III $\beta$  de mamíferos. A TOP3 $\beta$  exibe atividade  
820 de ligação e clivagem de DNA, semelhante às outras topoisomerases  
821 eucarióticas, sendo seus domínios e resíduos catalíticos importantes  
822 amplamente conservados. Esse achado sugere que as topoisomerases do tipo  
823 IA podem ter se desenvolvido antes da divergência de *Giardia* da linhagem  
824 eucariótica principal. A presença de pelo menos uma topoisomerase do tipo II e  
825 uma do tipo IA indica que essas enzimas desempenham papéis essenciais em  
826 diferentes organismos. Da mesma forma, *G. intestinalis* possui uma  
827 topoisomerase do tipo II e duas do tipo IA (SUN *et al.*, 2020).

828

## 829 **2. Justificativa**

830 A Giardíase é uma parasitose de caráter universal causada pelo  
831 protozoário *G. intestinalis* em humanos e animais domésticos como cães e  
832 gatos. Sendo uma enfermidade de alta prevalência, pode afetar pessoas de  
833 todas as idades e classes sociais, com impacto mais significativo nas  
834 populações de baixa renda. Esse cenário é agravado pela falta de saneamento  
835 básico e condições higiênicas adequadas nas regiões onde vivem as  
836 comunidades economicamente desfavorecidas, reflexo da ausência de políticas  
837 públicas eficientes voltadas para essas áreas. O tratamento contra essa

838 parasitose tem mostrado falho em muitos casos, uma vez que há na literatura  
839 prescritos para tal; além de haver registro de efeitos adversos associados aos  
840 fármacos utilizados atualmente. Neste contexto, faz-se necessário a busca e  
841 obtenção de alternativas para o tratamento contra o parasito. Deste modo, no  
842 presente estudo avaliamos os efeitos de inibidores de topoisomerase II, em  
843 especial norfloxacin, enoxacin e sal sódico do ácido nalidíxico, no parasito *G.*  
844 *intestinalis*. Estes fármacos demonstraram eficácia contra bactérias e contra  
845 outros protozoários como *Plasmodium falciparum*.

846

847

848

### 849 **3. Objetivos**

#### 850 **3.1. Objetivo Geral**

851           Verificar se os inibidores de topoisomerase tipo II apresentam atividade  
852 antiparasitária em *G. intestinalis* em ensaios *in vitro*.

#### 853 **3.2. Objetivos específicos**

854 • Avaliar a ação dos inibidores da enzima topoisomerase tipo II na proliferação e  
855 viabilidade dos trofozoítos.

856 • Avaliar se os inibidores de topoisomerase interferem no ciclo celular do  
857 parasito.

858 • Investigar se ocorre efeito citotóxico dos inibidores de topoisomerase em  
859 células de linhagem epitelial de intestino humano.

860 • Investigar os efeitos desses inibidores na morfologia do parasito.

861 • Analisar possíveis alterações na ultraestrutura de superfície e organelas dos  
862 trofozoítos tratados com inibidores de topoisomerase II.

863 • Investigar se o tratamento com inibidores de topoisomerase II induz a ativação  
864 de apoptose ou autofagia no parasito.

865

866

867

868

869

870

871

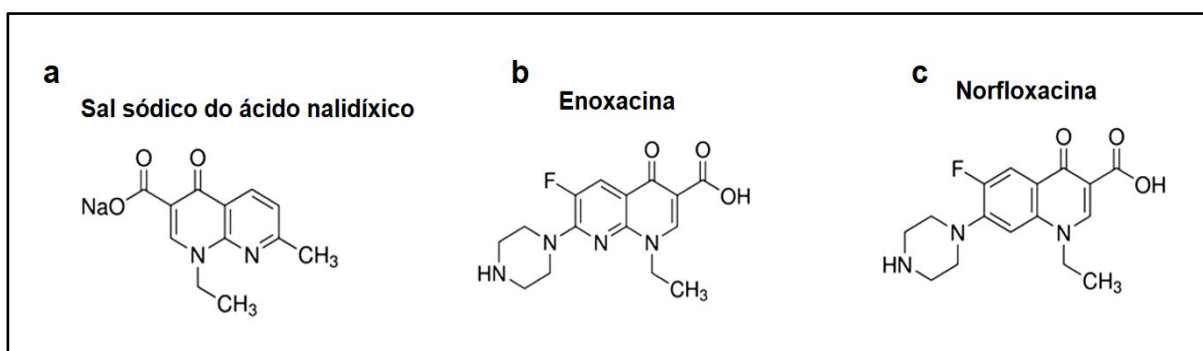
872

873

874 **4. Materiais e métodos**875 **4.1. Compostos**

876 Os inibidores de Topoisomerase II usados no estudo foram o sal sódico  
 877 do ácido nalidíxico, da classe das quinolonas e a enoxacina e a norfloxacina, da  
 878 classe das fluoroquinolonas e todos adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich -  
 879 EUA) (**Fig. 7**). Os compostos foram pesados e diluídos em hidróxido de sódio -  
 880 NaOH (Sigma- Aldrich - EUA) 100 mM para uma concentração estoque de 10  
 881 mM (ZUMA *et al.*, 2011). Estes compostos foram mantidos a -20°C. As  
 882 concentrações finais utilizadas nos ensaios abaixo descritos estão apresentados  
 883 no **Quadro 2**. Em todos os ensaios, utilizamos como controle os fármacos  
 884 metronizadol ou albendazol já consolidados no mercado para o tratamento da  
 885 giardíase.

886



887 **Figura 7. Inibidores de topoisomerase II utilizados neste estudo.** A estrutura  
 888 química dos compostos é mostrada.

889

| Fármaco                        | Concentrações testadas                          | Empresa/ País       |
|--------------------------------|---|---------------------|
| Sal sódico do ácido nalidíxico | 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM | Sigma-Aldrich - USA |
| Enoxacina                      | 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM | Sigma-Aldrich - USA |
| Norfloxacina                   | 1 µM, 5 µM, 10 µM e 20 µM                       | Sigma-Aldrich - USA |

890 **Quadro 2. Compostos e concentrações utilizadas.** Os fármacos, as concentrações e  
 891 empresas de onde foram adquiridos são mostrados.

892

## 893 4.2. Cultivo dos parasitos

894 Os trofozoítos de *G. intestinalis*, cepa WB (*American Type Culture*  
 895 *Collection*, ATCC 30957, EUA), foram cultivados em meio de cultura TYI-S-33  
 896 (**Quadro 3**) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco - América  
 897 do Sul). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C. O subcultivo foi feito a  
 898 cada 72 h empregando tubos cônicos plásticos de 15 mL. Para os experimentos,  
 899 os parasitos foram utilizados na fase logarítmica de crescimento.

900

| Componentes do meio TYI- S-33  |              |                    |
|--------------------------------|--------------|--------------------|
| Reagente                       | Concentração | Empresa/ País      |
| Tryptone                       | 2 %          | Sigma-Aldrich, USA |
| Extrato de levedura            | 1 %          | BD, França         |
| Glicose                        | 1 %          | Vetec, Brasil      |
| Ácido Ascórbico                | 0,02 %       | Sigma-Aldrich, USA |
| Fosfato de potássio monobásico | 0,06 %       | Vetec, Brasil      |
| Fosfato de potássio dibásico   | 0,12 %       | Vetec, Brasil      |
| L-cisteína                     | 0,2 %        | Sigma-Aldrich, USA |
| Bile Bovina                    | 0,1 %        | Sigma-Aldrich, USA |
| Cloreto de sódio               | 0,2 %        | Vetec, Brasil      |

901 **Quadro 3: Componentes do meio TYI-S-33 para cultivo de *G. intestinalis*.** Os  
 902 reagentes, as concentrações usadas e empresas onde de onde foram adquiridos são  
 903 mostrados.

904

## 905 4.3. Cultivo das células intestinais humanas

906 As células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2 (*Caucasian Colon*  
 907 *Adenocarcinoma*; ® HTB37; *American Type Culture Collection*) foram cultivadas  
 908 em meio DMEM High Glucose (*Dulbbeco's Modified Eagle Medium*; Gibco, EUA)  
 909 (**Quadro 4**) acrescido de 10% de soro fetal bovino, a 37°C em uma atmosfera  
 910 de 5% de CO<sub>2</sub>. Essas culturas tiveram o meio suplementado com 1% de

911 antibiótico (*Penicillin-Streptomycin* 10000 U/mL, Gibco, ref.:15140122) e foram  
912 mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

913 O subcultivo foi feito a cada cinco dias, utilizando garrafas plásticas de 25  
914 cm<sup>2</sup> (Eppendorf, Alemanha), trocando-se o meio a cada 72 h. Ao atingirem  
915 confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática  
916 tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, ref.: 25300054) por 2 a 5 minutos a 37°C. Para a  
917 realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas e  
918 semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade celular de 1 x 10<sup>5</sup>  
919 células/poço.

| <b>Componentes do meio de cultivo das células CACO-2</b> |                     |                       |
|--|---------------------|-----------------------|
| <b>Reagente</b>  | <b>Concentração</b> | <b>Empresa/ País</b>  |
| <b>DMEM High Glucose</b>                                 | X mL                | Gibco, USA            |
| <b>Soro Fetal Bovino</b>                                 | 10 %                | Gibco, América do Sul |
| <b>L-Glutamina</b>                                       | 1 %                 | Sigma-Aldrich, Brasil |

920 **Quadro 4. Componentes do meio para cultivo das células de mamíferos Caco-2.**  
921 Reagentes, concentrações e empresa de onde foram adquiridos são mostrados.

922

#### 923 4.4. Curva de Crescimento

924 Os trofozoítos (10<sup>5</sup> céls/ml) foram cultivados em tubos de 1.5 mL  
925 (Eppendorf, Alemanha) contendo meio TYI-S-33 suplementado com 10% de  
926 soro fetal bovino (Gibco - América do Sul). Os compostos foram adicionados às  
927 culturas no tempo de 0 h nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µM. O NaOH  
928 (Sigma, EUA) foi utilizado como controle negativo nas concentrações de 0.02,  
929 0.01, 0.005 e 0.001 mM. O metronidazol (Sigma-Aldrich, Brasil) foi utilizado  
930 como fármaco padrão de escolha para comparação na concentração de 10 µM  
931 (controle positivo). As culturas tratadas e não-tratadas foram mantidas a 37°C  
932 por 24, 48 e 72 h. Após estes intervalos, os microtubos contendo os parasitos  
933 controle e tratados foram vigorosamente agitados, centrifugados (Centrífuga  
934 Eppendorf, Alemanha, rotor: 5427) por 5 min, 150 g, posteriormente diluídos  
935 1:10 em formaldeído 4% nascente a partir do paraformaldeído (Merck,  
936 Alemanha) em tampão fosfato, pH 7.2. As células foram contadas usando um

937 hemocítômetro (câmara de Neubauer). As contagens foram realizadas no  
938 microscópio óptico Leica DM500 ou Zeiss AXIO Lab.A1 na objetiva de 20x.

939 As curvas de crescimento do parasito foram elaboradas a partir da  
940 seguinte fórmula:  $(A \div 4) \times B \times C$  onde A = N° de células contadas e somadas  
941 nos quatro quadrantes da Câmara de Neubauer; B = 104 (Fator da Câmara de  
942 Neubauer); C = Fator de diluição utilizada ou não. Os experimentos foram  
943 realizados em triplicatas independentes e os resultados foram analisados  
944 através da utilização do programa analítico GraphPad Prism 8.00 (EUA). As  
945 curvas de crescimento do parasito foram elaboradas para o cálculo do valor da  
946 IC<sub>50</sub>.

#### 947 **4.4.1. Cálculo de IC<sub>50</sub>**

948 Para determinar a concentração do composto que inibiu o crescimento do  
949 parasita em 50% (IC<sub>50</sub>), a porcentagem de inibição do crescimento foi plotada  
950 em função da concentração do fármaco, e os valores foram ajustados em uma  
951 curva não linear. As análises de regressão foram realizadas e os dados foram  
952 plotados usando o GraphPad Prism 8.00 (EUA).

$$I = I_{\max} \times \frac{C}{IC_{50} + C}$$

953

954 Onde I corresponde a porcentagem (%) de inibição, I maxx = 100% de  
955 inibição, C a concentração de inibição e IC<sub>50</sub> à concentração responsável por  
956 inibir 50% do crescimento.

#### 957 **4.5. Atividade metabólica dos trofozoítos**

958 Para avaliar os efeitos dos inibidores de topoisomerase II na viabilidade  
959 celular de *G. intestinalis*, células foram cultivadas nas mesmas condições  
960 descritas para o ensaio anterior (4.4). Para este experimento o albendazol  
961 (Sigma-Aldrich, Brasil) foi o composto escolhido para ser utilizado como controle  
962 positivo. Após 24 h ou 48 h, os microtubos contendo os parasitos controles e  
963 tratados foram vigorosamente agitados, em seguida, centrifugados (Centrífuga

964 5427 R) por 5 min à 150 g, ressuspensos em 500 µL de solução salina  
965 tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2, suplementada com 10 mM de glicose.  
966 Uma alíquota de 100 µL foi distribuída por poço em placa de 96 poços em  
967 triplicada, para cada condição. Como controle negativo, três poços de células  
968 não tratadas foram fixados com 0,4% de formaldeído (Merck, Alemanha).  
969 Depois, 20 µL de uma solução de PMS/MTS [50 µL da solução estoque do PMS  
970 (Promega) em 1 mL da solução estoque do MTS (Promega)] foi adicionada em  
971 cada poço [concentração final de MTS com 40 µg (333 µg/mL) e PMS com 0,92  
972 µg (25 µM) por poço. As amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas na  
973 ausência de luz. As análises foram realizadas usando o comprimento de onda  
974 de 490nm no leitor de placas *Molecular Devices Microplate Reader* ou  
975 Spectramax® (*Molecular Devices M2*, EUA) que avalia o comprimento da onda  
976 emitido do substrato formazan, resultado da reação enzimática nas células. Em  
977 células viáveis, o reagente PMS é reduzido e seus elétrons são transferidos  
978 para o MTS, que é convertido por desidrogenases em formazan (um composto  
979 solúvel em água), modificando a cor do substrato de modo proporcional ao  
980 número de células viáveis (HENRIQUES *et al.*, 2011).

981

#### 982 **4.6. Análise da toxicidade em células de mamíferos**

983 As células *Caco-2* (1x10<sup>5</sup> células/ml) foram cultivadas em placas de 96  
984 poços com meio DMEM acrescido de 10% SFB com um volume final de 200 µL  
985 por poço em triplicata. Os inibidores de topoisomerase foram adicionados 24 h  
986 após o plaqueamento das células *Caco-2*, nas concentrações de 10 µM, 20 µM,  
987 50 µM e 100 µM; o NaOH 0.2 M (Sigma, EUA) foi utilizado como controle  
988 negativo. As culturas foram mantidas por mais 72 h a 37°C em uma atmosfera  
989 de 5% de CO<sub>2</sub>, contabilizando 96 h totais de plaqueamento das células e 72 h  
990 de incubação com os compostos. Após este período todo o meio DMEM foi  
991 retirado e a células foram lavadas em 300 µL de PBS com 10 mM de glicose,  
992 pH 7.2. Depois os poços foram preenchidos com 100 µL dessa mesma solução  
993 e o controle negativo foi realizado utilizando três poços de células (não tratadas)  
994 fixados com 4% de formaldeído. A análise se seguiu de acordo como descrito

995 no item 4.5. O índice de seletividade (IS) foi calculado da seguinte forma: IS=  
996  $IC_{50}$  para o alvo não desejado /  $IC_{50}$  para o alvo desejado.

997

#### 998 **4.7. Ensaio de reversibilidade**

999 Trofozoítos ( $5 \times 10^5$  células/ml) foram inoculados em microtubos de 1,5 ml  
1000 (Eppendorf, Alemanha) contendo meio TYI-S-33 suplementado com 10% de  
1001 SFB (Gibco, América do Sul). Os compostos foram adicionados às culturas nas  
1002 concentrações de 5, 25, 50 e 100  $\mu$ M por 5 h a 37°C (ABRAHAM *et al*, 2019).  
1003 Depois, as células foram coletadas colocando os tubos no gelo por 20 min,  
1004 seguido de centrifugação a 900 g por 5 min. O sobrenadante foi removido e as  
1005 células foram ressuspensas em meio TYI-S-33 frescos suplementado com 10%  
1006 de SFB (Gibco, América do Sul). O número de trofozoítos foi contado usando  
1007 um hemocítmetro e as células foram incubadas por 48 h, com o número de  
1008 células sendo determinado em 0 h (após as 5 h de tratamento inicial), 24 h e 48  
1009 h. As células foram contadas usando um hemocítmetro (câmara de Neubauer).  
1010 As contagens foram realizadas no microscópio óptico Leica DM500 ou Zeiss  
1011 AXIO Lab.A1 na objetiva de 20x.

1012

#### 1013 **4.8. Imunofluorescência**

##### 1014 **4.8.1. Análise do citoesqueleto**

1015 Os parasitos tratados e não-tratados foram lavados duas vezes com PBS  
1016 e, em seguida, permitiu-se que aderissem a lamínulas previamente revestidas  
1017 com 0,1% de poli-L-lisina (Sigma, EUA). Após 10 minutos, as células foram  
1018 fixadas com metanol (Merck, Alemanha) gelado por 5 minutos em seguida  
1019 lavadas duas vezes com PBS. Após essa etapa, realizou-se um bloqueio de 1  
1020 hora (PBS contendo 3% de albumina de soro bovino - BSA, pH 8,0). As células  
1021 foram então incubadas na presença do anticorpo primário TAT-1 diluído 1:50,  
1022 gentilmente fornecido pelo Dr. K. Gull (KOHL *et al.*, 1999). Posteriormente, as  
1023 amostras foram lavadas quatro vezes com PBS + BSA e incubadas por 1 hora  
1024 com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488,  
1025 diluído 1:400 (Thermo Fisher, EUA). As células foram lavadas três vezes e

1026 incubadas com Hoechst (Thermo Fisher, EUA; 5 µg/ml) por 10 minutos. Como  
1027 controle, o anticorpo primário foi omitido. As amostras foram analisadas com o  
1028 módulo LSM 710 e SR-SIM (Microscopia de Iluminação Estruturada de Super-  
1029 Resolução) utilizando o Zeiss Elyra PS.1 (Zeiss, Alemanha).

1030

#### 1031 **4.8.2. Avaliação da fragmentação nuclear**

1032 Os trofozoítos não-tratados e os tratados foram lavados duas vezes com  
1033 PBS e, em seguida, deixados para aderir a lamínulas revestidas com poli-L-  
1034 lisina (Sigma, EUA) a 0,1% por 10 min. As células foram então lavadas com  
1035 PBS e fixadas com formaldeído (Merck, Alemanha) a 4% por 15 min. Em  
1036 seguida, os parasitos foram permeabilizados com Triton-X-100 a 0,25% em PBS  
1037 por 20 min e lavados três vezes com PBS por 1 min. Finalmente, o ensaio foi  
1038 realizado usando o kit click-iT TUNEL *Alexa Fluor Imaging Assay (Molecular*  
1039 *Probes, Inc)*, de acordo com as instruções do fabricante. A marcação nuclear foi  
1040 realizada usando Hoechst 33342. As células foram visualizadas usando um  
1041 módulo LSM 710 e SR-SIM (Microscopia de Iluminação Estruturada de Super-  
1042 Resolução) usando o Zeiss Elyra PS.1 (Zeiss, Alemanha).

1043

#### 1044 **4.8.3. Parede cística**

1045 Os cistos foram adquiridos através do kit A100FLK *Aqua-Glo™ G/C*  
1046 *Direct Comprehensive (Waterborne, inc- USA)* e foram processados juntamente  
1047 com os parasitos tratados e não-tratados da seguinte forma: foram lavados duas  
1048 vezes com PBS e, em seguida, permitiu-se que aderissem à lamínulas  
1049 previamente revestidas com 0,1% de poli-L-lisina (Sigma, EUA). Após 10  
1050 minutos, as células foram fixadas com metanol (Merck, Alemanha) gelado por 5  
1051 minutos em seguida lavadas duas vezes com PBS. Após essa etapa, realizou-  
1052 se um bloqueio de 1 hora (PBS contendo 3% de albumina de soro bovino - BSA,  
1053 pH 8,0). As células foram então incubadas na presença do anticorpo primário  
1054 monoclonal 6H12- anti CWP1, uma proteína da parede cística, diluído 1:100,  
1055 gentilmente fornecido pelo Dr. Hugo Luján (Universidade de Córdoba,  
1056 Argentina). Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS + BSA e

1057 incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo  
1058 conjugado com Alexa 546, diluído 1:400 (Thermo Fisher, EUA). As células  
1059 foram lavadas três vezes e incubadas com Hoechst (Thermo Fisher, EUA; 5  
1060 µg/ml) por 10 minutos. Como controle, o anticorpo primário foi omitido. As  
1061 amostras foram analisadas com o módulo LSM 910 utilizando o microscópio  
1062 confocal Zeiss (Zeiss, Alemanha).

1063

#### 1064 **4.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

1065 As amostras foram fixadas por 1 h em uma solução contendo 2,5% de  
1066 glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, EUA) em tampão cacodilato 0,1  
1067 M (pH 7,2) e pós-fixadas por uma 1 h com 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) em  
1068 tampão cacodilato 0,1 M. Após esse procedimento, as amostras foram lavadas  
1069 em PBS pH 7.2 por 3 vezes e desidratadas em soluções progressivas de etanol  
1070 (Merck, Alemanha) (15%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, absoluto e super-  
1071 seco por duas vezes) por 15 min cada série. Posteriormente, foram secas pelo  
1072 método de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030, Alemanha) ou (Leica CPD 300,  
1073 Alemanha), em seguida, foram montadas em suportes metálicos para MEV  
1074 (*stubs*) e recobertas com 8 nm de ouro utilizando metalizador FL-9496 (Balzers  
1075 Union) ou 10 nm de platina utilizando o metalizador Quorum Q150RS (“Sputter  
1076 Coater”). Para a remoção da membrana, as células foram tratadas com 2% de  
1077 NP-40 mais 2% de Triton X-100 por 10 min antes da fixação. O detergente foi  
1078 diluído em tampão PHEM (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 70 mM KCl, 20 mM HEPES, 60 mM  
1079 Pipes e 10 mM EGTA), pH 7,2. As amostras foram observadas em um  
1080 microscópio ZEISS EVO MA10 (Zeiss, Alemanha) ou, alternativamente, no  
1081 microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo FEI Quanta FEG  
1082 450 (FEI Company, Holanda).

1083

#### 1084 **4.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

1085 As amostras foram lavadas em PBS, pH 7.2 e, posteriormente, fixadas  
1086 por uma hora à temperatura ambiente em uma solução contendo 2,5% de  
1087 glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). As

1088 amostras foram então lavadas duas vezes em PBS, pH 7,2, e pós-fixadas em  
1089 1% de OsO<sub>4</sub> e 0,8% de ferrocianeto de potássio. Após a pós-fixação, as  
1090 amostras foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7.2, e desidratadas em soluções  
1091 progressivas de acetona (Merck, Alemanha) (50%, 70%, 90%, absoluto e  
1092 realizado 3 trocas com acetona super-seca), deixando as amostras por 15 min  
1093 em cada etapa. A infiltração foi feita gradualmente por misturas de acetona:  
1094 epon 2:1 por 6 h, 1:1 e 1:2 por 8 h e resina pura por 12 h, posteriormente o  
1095 material foi colocado em moldes e polimerizado na estufa a 60°C, por 72 h.  
1096 Depois de polimerizados, os blocos foram trimados, seccionados com uma faca  
1097 de diamante (Drukker, Reino Unido) no ultramicrótomo Leica (Alemanha)  
1098 ULTRACUT UCT 6 ou 7 e os cortes coletados em grades de cobre de 300 *mesh*.  
1099 Os cortes ultrafinos de 70 nm foram contrastados com acetato de uranila 5% em  
1100 água por 40 minutos e em citrato de chumbo por 3 minutos e visualizados ao  
1101 microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit (FEI, Holanda),  
1102 operando a 80 kV.

1103

#### 1104 **4.11. Ciclo celular**

1105 Os trofozoítos, tanto controle quanto tratados, foram mantidos em gelo  
1106 por 15 a 20 minutos para facilitar a separação celular. As células foram então  
1107 centrifugadas a 800 × g (Centrífuga Eppendorf, Alemanha, rotor: 5427) durante  
1108 5 minutos, seguido pela retirada do sobrenadante. O pellet foi lavado duas  
1109 vezes com 2 ml de solução salina tamponada com HEPES (150 mM NaCl, 5  
1110 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, pH 7,4) (POXLEITNER *et al.*, 2008).  
1111 Para o processo de fixação, as células foram ressuspensas em 300 µl da  
1112 solução salina tamponada com HEPES, e 700 µl de etanol 100% gelado foram  
1113 adicionados gradualmente, enquanto a suspensão era submetida a vórtice  
1114 suave. Neste estágio, as células puderam ser armazenadas a 4°C. As culturas  
1115 foram posteriormente centrifugadas, e o pellet foi lavado com 50 mM de citrato  
1116 de sódio (Sigma) e ressuspenso em 0,5 ml da mesma solução contendo RNase  
1117 A a 0,1 mg/ml. A suspensão foi incubada durante a noite a 4°C. Imediatamente  
1118 antes da análise por citometria de fluxo, 0,5 ml de solução de citrato de sódio 50  
1119 mM contendo 10 µM de SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain (Sigma) foram

1120 adicionados, resultando em uma concentração final de SYTOX™ Green Nucleic  
1121 Acid Stain de 5 µM. As análises foram realizadas em um citômetro de fluxo BD  
1122 FACSCalibur, e os dados foram adquiridos utilizando o software Accuri.

#### 1123 4.12. Análise estatística

1124 Os valores são expressos como média ± erro padrão e comparados por  
1125 ANOVA bidirecional com teste de comparação múltipla de *Bonferroni* ou  
1126 ANOVA unidirecional com teste de comparação múltipla de *Dunnet* (Prism 8  
1127 Software Inc.). Valores de  $p$  inferiores a 0,05 foram considerados  
1128 estatisticamente significativos.

1129

## 1130 5. RESULTADOS

### 1131 5.1. Ensaio de proliferação

1132 Para avaliação do crescimento dos trofozoítos expostos ao sal sódico do  
1133 ácido nalidíxico (Fig. 8a), enoxacina (Fig. 8b) e norfloxacina (Fig. 8c), nas  
1134 concentrações de 1, 5, 10 e 20 µM, realizamos uma curva de crescimento a fim  
1135 de obtermos a IC<sub>50</sub>. Como comparação, utilizamos controles sem tratamento  
1136 (controle negativo) e com o fármaco padrão, o metronidazol na concentração de  
1137 10 µM (controle positivo). Observamos uma diminuição na proliferação do  
1138 parasito a após 24 hs de tratamento com esses três compostos quando  
1139 comparado ao controle negativo (**Fig. 8a-c**). No entanto, essa redução não foi  
1140 estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ). A inibição do crescimento do parasito  
1141 a se intensificou após 48 h de tratamento, houve uma redução da proliferação  
1142 celular estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ), nos fármacos 10 e 20 µM de sal  
1143 sódico do ácido nalidíxico, sendo a diminuição na concentração de 10 µM  
1144 similar a redução induzida pelo metronidazol, na concentração testada (**Fig. 8a**).  
1145 Além disso, uma redução na proliferação do parasito também foi observada em  
1146 concentrações acima de 10 µM de enoxacina ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 8b**). A  
1147 norfloxacina sugere uma redução na proliferação do parasito dentro de 48 h de  
1148 tratamento, mas essa não foi estatisticamente significante (**Fig. 8c**).

1149 Após 72 h de exposição aos compostos, ficou evidente que o parasito  
1150 tratado com o composto sal sódico do ácido nalidíxico apresentou redução em  
1151 sua proliferação quando comparado à cultura controle (**Fig. 8a**). Essa

1152 diminuição foi estatisticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) em todas as  
1153 concentrações testadas. Importante destacar que a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de  
1154 sal sódico do ácido nalidíxico teve um efeito similar ao metronidazol na mesma  
1155 concentração. O crescimento do trofozoíto também foi inibido pela enoxacina  
1156 em 72 h (**Fig. 8b**). Diferentemente dos outros compostos, a norfloxacina  
1157 somente reduziu significativamente a proliferação celular na concentração de 20  
1158  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.0001$ ) (**Fig. 8c**). Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para os três compostos foram  
1159 determinados em 48 e 72 h e são mostrados na **Quadro 5**.

1160 Para averiguar se foram realmente os compostos que inibiram a  
1161 proliferação do parasito e não o solvente em que foram diluídos, realizamos  
1162 curvas de crescimento em que adicionamos diferentes concentrações de NaOH  
1163 às culturas de trofozoítos (**Fig. 9**). Não houve alteração na proliferação do  
1164 parasito em nenhuma das concentrações utilizadas do NaOH ( $p > 0.05$ ),  
1165 sugerindo assim, que o efeito inibitório na proliferação observado nas curvas  
1166 anteriores é proveniente da ação dos compostos, ou seja, todas as alterações  
1167 que ocorreram na curva de crescimento das culturas de *G. intestinalis* tratadas  
1168 com sal sódico do ácido nalidíxico, enoxacina e norfloxacina, não tiveram  
1169 influência do solvente.

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

1181

1182

1183

1184

1185

1186

1187

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1199

1200

1201

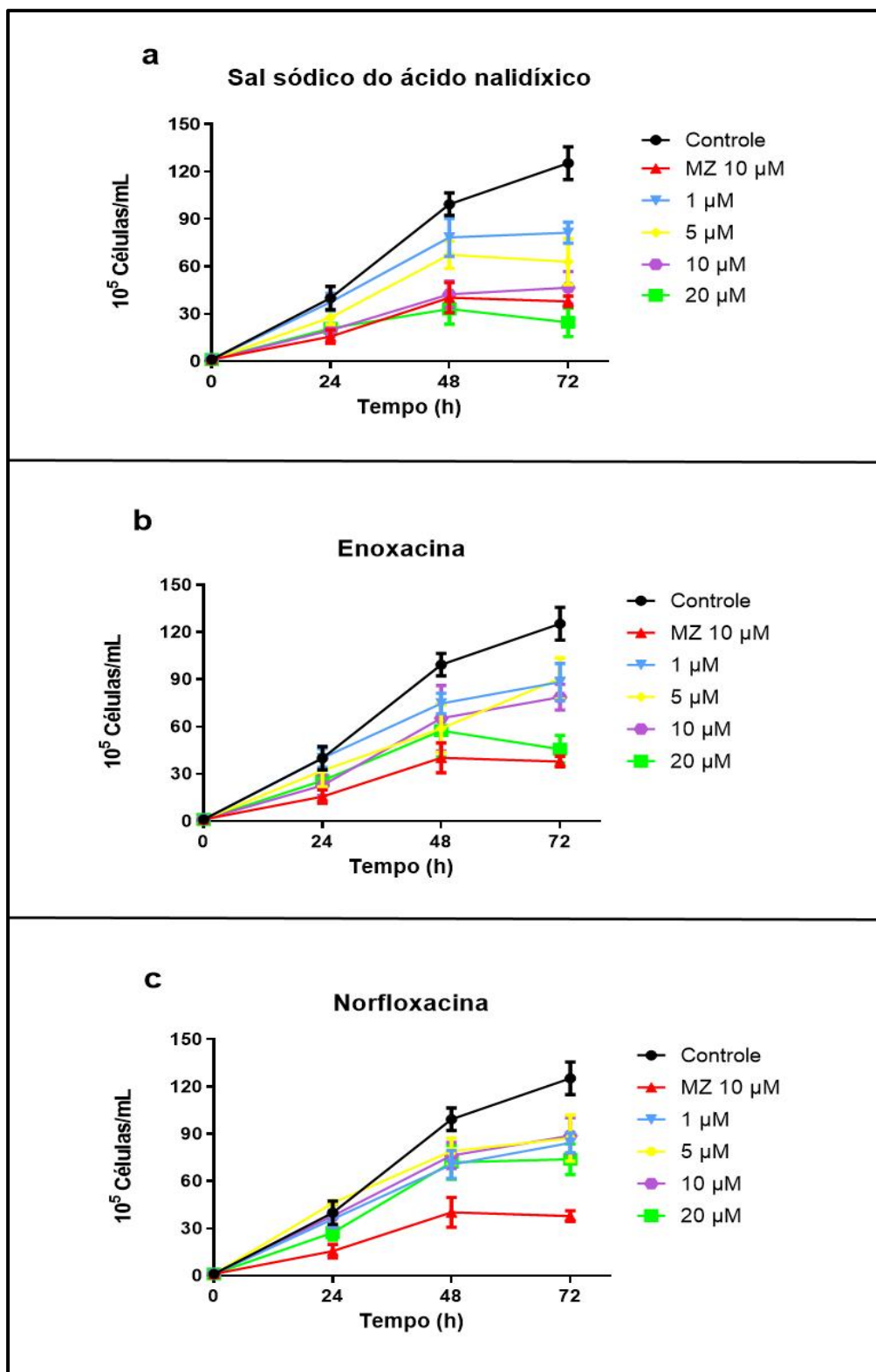
1202

1203

1204

1205

1206



1207

1208

1209 **(a).** Trofozoítos incubados com sal sódico de ácido nalidíxico. **(b).** Trofozoítos

1210 incubados com enoxacina. **(c).** Trofozoítos incubados com norfloxacina. Os resultados

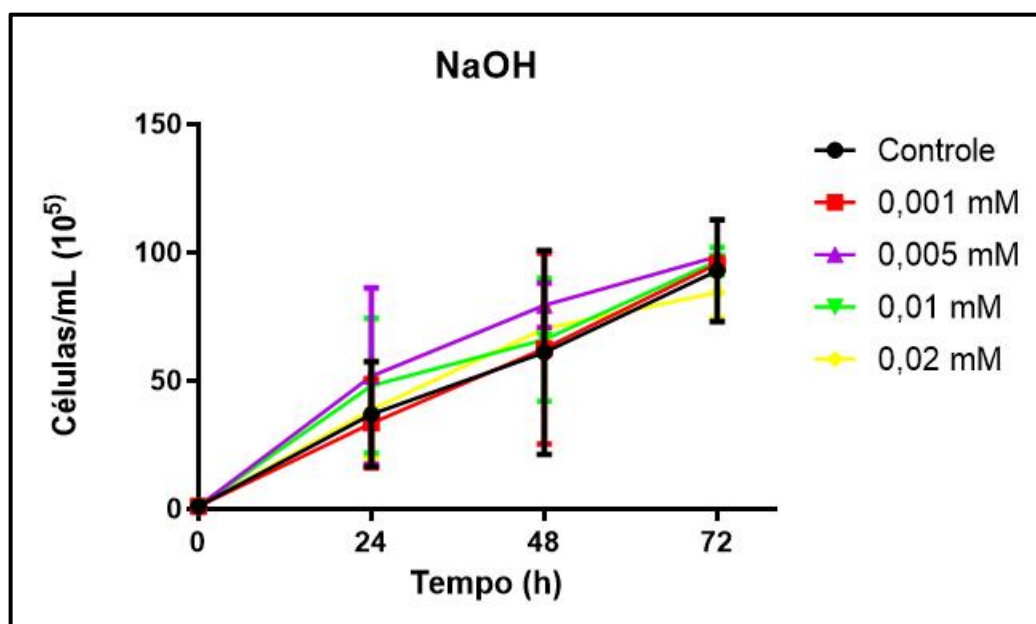
1211 são expressos como média  $\pm$  SEM (N = 4).

| Sal Sódico do Ácido Nalidíxico |                   | Enoxacina |                    | Norfloxacina |                    |
|--------------------------------|-------------------|-----------|--------------------|--------------|--------------------|
| Tempo                          | Concentração      | Tempo     | Concentração       | Tempo        | Concentração       |
| 48 h                           | 8,8 $\mu\text{M}$ | 48 h      | 29,3 $\mu\text{M}$ | 48 h         | > 50 $\mu\text{M}$ |
| 72 h                           | 4,3 $\mu\text{M}$ | 72 h      | 13,3 $\mu\text{M}$ | 72 h         | > 50 $\mu\text{M}$ |

1212 **Quadro 5. Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os inibidores de topoisomerase em *G.***  
 1213 ***intestinalis*.** Os valores são mostrados para cada composto nos tempos de 48 e 72 h.

1214

1215



1216 **Figura 9. Curva de crescimento dos trofozoítos em 24, 48 e 72 h cultivados na**  
 1217 **ausência (controle) ou na presença do NaOH em diferentes concentrações. Os**  
 1218 **resultados são expressos como a média  $\pm$  SEM (N = 3).**

1219

## 1220 5.2. Atividade metabólica

1221 A avaliação da atividade metabólica do parasito foi medida através do  
1222 ensaio MTS/PMS. O ensaio foi realizado com os compostos sal sódico do ácido  
1223 nalidíxico, enoxacina e norfloxacina nas concentrações de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M,  
1224 20  $\mu$ M nos tempos de 24, 48 e 72h (**Fig. 10a-c**). O albendazol na concentração  
1225 de 10  $\mu$ M foi utilizado como fármaco-controle para comparação. O NaOH (0,2M)  
1226 e o formaldeído 4% foram utilizados como controles negativo e positivo,  
1227 respectivamente, nos mesmos tempos. As células tratadas com o composto sal  
1228 sódico do ácido nalidíxico (**Fig. 10a**) apresentaram redução da viabilidade nas  
1229 primeiras 24 h, principalmente nas concentrações de 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M, o que não  
1230 foi observado com o 10  $\mu$ M albendazol na concentração testada ( $p > 0.0001$ ).  
1231 Após 48 e 72 h de tratamento, a redução se manteve nas maiores  
1232 concentrações ( $p > 0.0001$ ) quando este composto foi utilizado. Já as células  
1233 tratadas com o composto enoxacina (**Fig. 10b**) apresentaram redução na  
1234 viabilidade em 24 h quando tratadas com a concentração de 20  $\mu$ M, efeito que  
1235 se repetiu nos tempos seguintes. O composto norfloxacina (**Fig. 10c**) não  
1236 alterou a viabilidade celular de forma significativa em nenhuma das  
1237 concentrações e em nenhum dos tempos estabelecidos, tendo sua maior taxa  
1238 de inibição igual a 21%, sendo esta redução não significativa (**FIG. 10c**).

1239 Dado que o composto norfloxacina não apresentou influência expressiva  
1240 sobre a proliferação (**item 5.1**) e a atividade metabólica (**item 5.2**), os ensaios  
1241 subsequentes foram realizados exclusivamente com os compostos sal sódico  
1242 do ácido nalidíxico e a enoxacina.

1243

1244

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

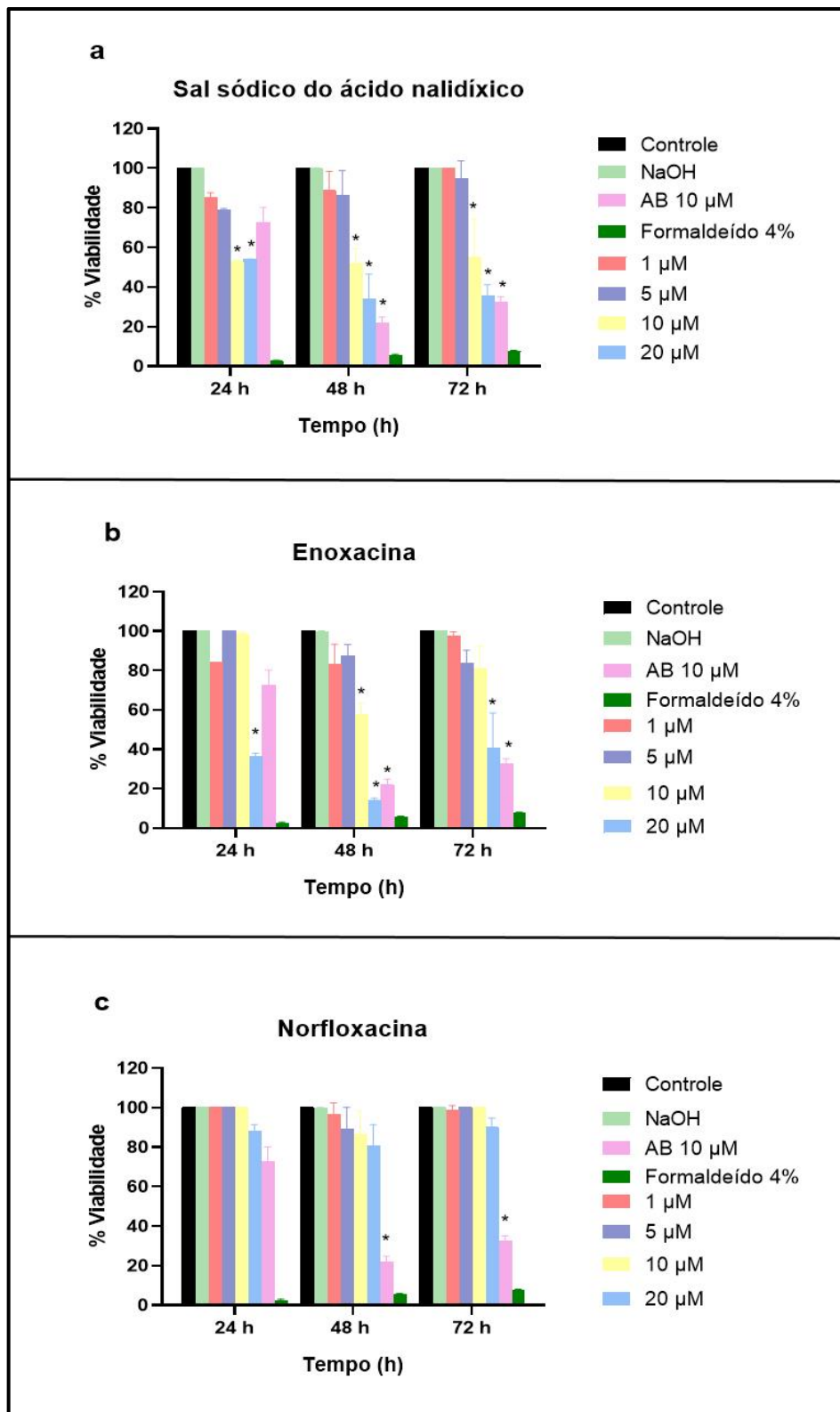
1273

1274

1275

1276

1277



1278

1279

1280

1281

1282

**Figura 10. Viabilidade dos trofozoítos após 24, 48 e 72 h de tratamento com inibidores de topoisomerase II. (a) Trofozoítos incubados com sal sódico de ácido nalidíxico. (b). Trofozoítos incubados com enoxacina. (c). Trofozoítos incubados com norfloxacina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM. Os controles foram considerados como 100% (N = 3. \* =  $p < 0,0001$ ).**

### 1283 5.3. Ensaio de Reversibilidade

1284 Com o objetivo de verificar a transitoriedade do efeito do composto,  
 1285 verificando se os trofozoítos são capazes de recuperar sua capacidade de  
 1286 proliferação após a remoção do inibidor, nesse ensaio o intervalo de 5 horas foi  
 1287 selecionado com o objetivo de assegurar que o fármaco exercesse seu efeito  
 1288 inicial sobre os trofozoítos sem, no entanto, causar danos irreversíveis. Após 24  
 1289 horas, observou-se um aumento no número de células em todas as culturas  
 1290 previamente expostas ao composto sal sódico do ácido nalidíxico e ao  
 1291 metronidazol, em comparação ao tempo anterior (5 h) (**Fig. 11a-b**). No entanto,  
 1292 esse crescimento foi significativamente menor quando comparado aos  
 1293 controles, resultando em diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) na proliferação  
 1294 entre as culturas tratadas e não tratadas neste intervalo (**Fig.11a-b**). O mesmo  
 1295 ocorreu para enoxacina (**Fig 12**).

1296

1297

1298

1299

1300

1301

1302

1303

1304

1305

1306

1307

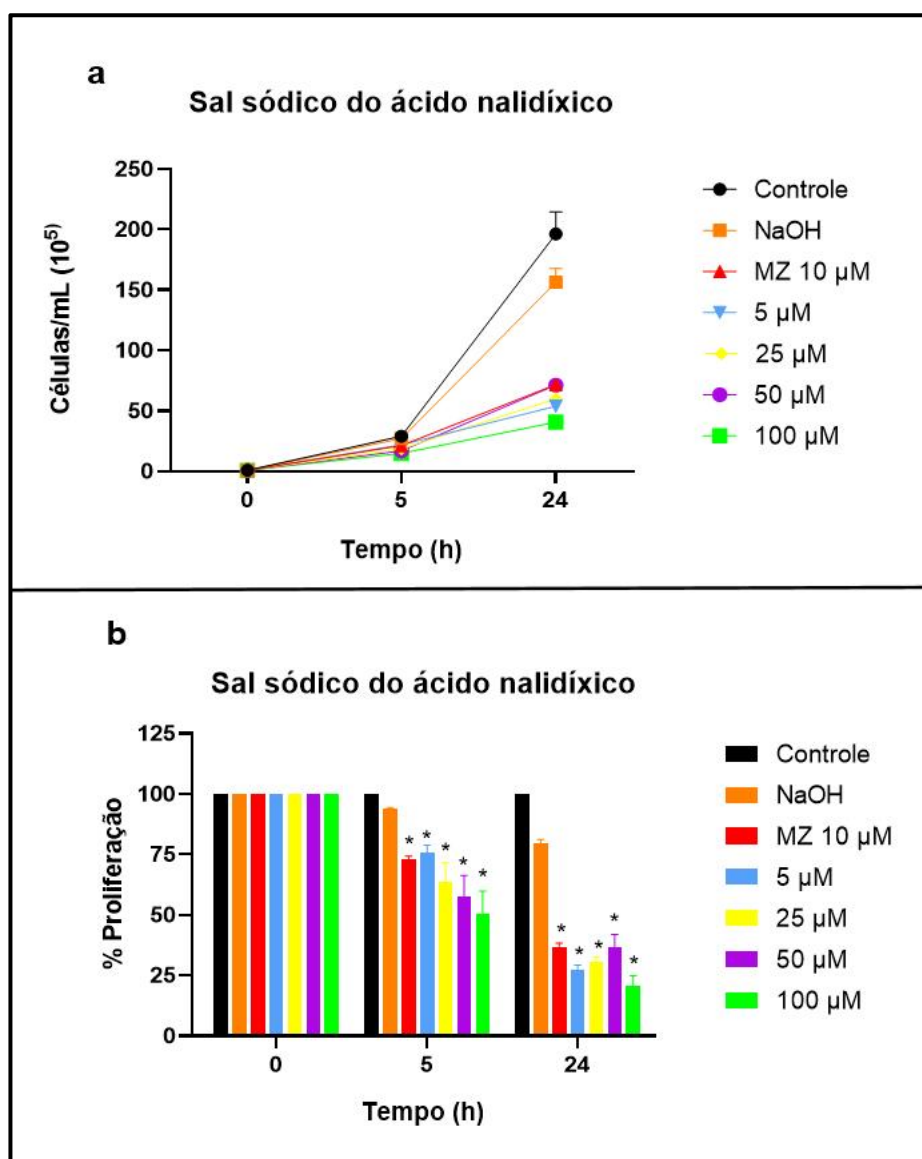
1308

1309

1310

1311

1312



1313 **Figura 11. Ensaio de reversibilidade com o sal sódico do ácido nalidíxico. (a)**  
 1314 **Curva de crescimento. (b) Proliferação em barra. (N= 2. \* =  $p < 0,0001$ ).**

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

1322

1323

1324

1325

1326

1327

1328

1329

1330

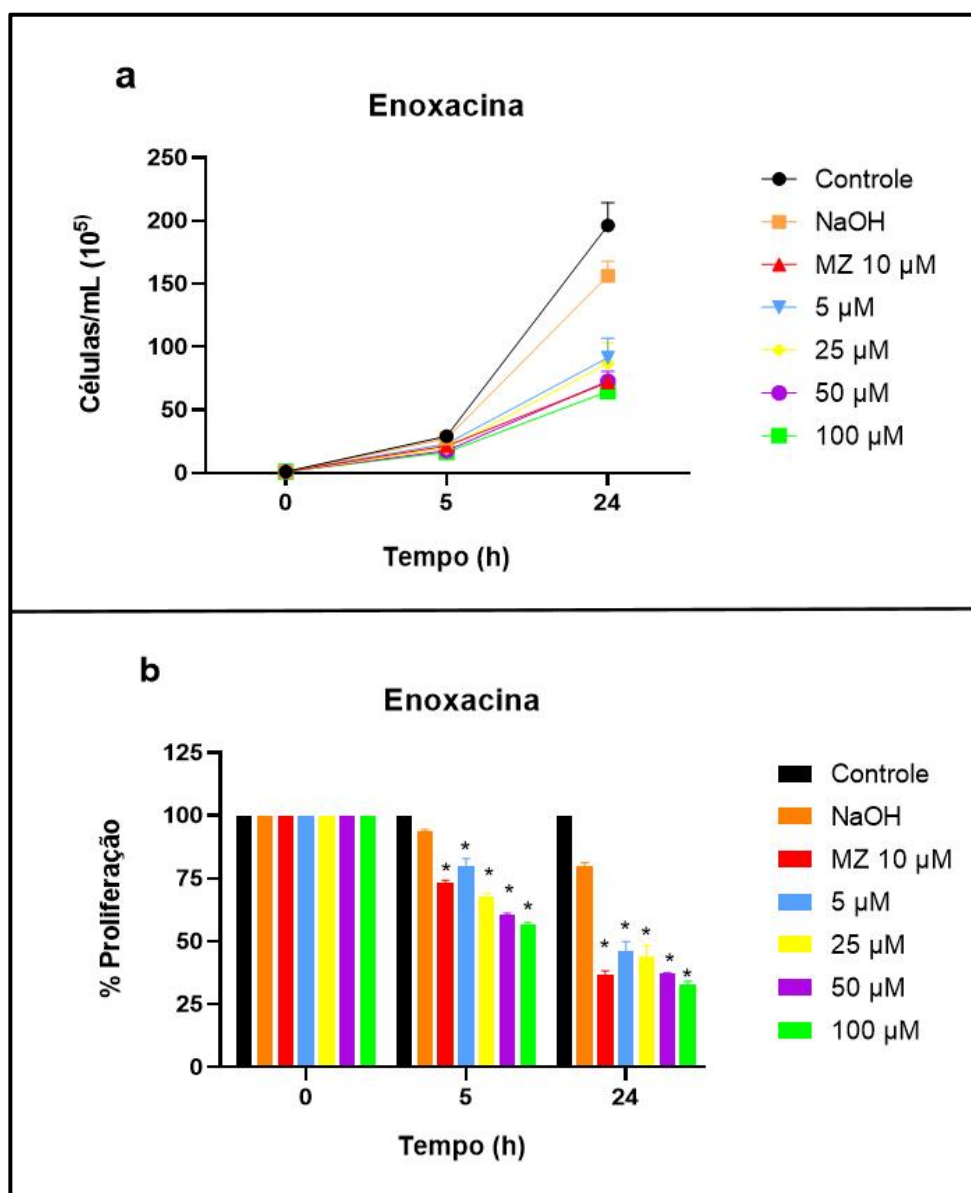
1331

1332

1333

1334

1335



1336 **Figura 12. Ensaio de reversibilidade com enoxacina. (a) Curva de crescimento. (b)**  
 1337 **Proliferação em barra. (N = 2. \* =  $p < 0,0001$ ).**

1338

#### 1339 5.4. Ciclo celular

1340

1341

1342

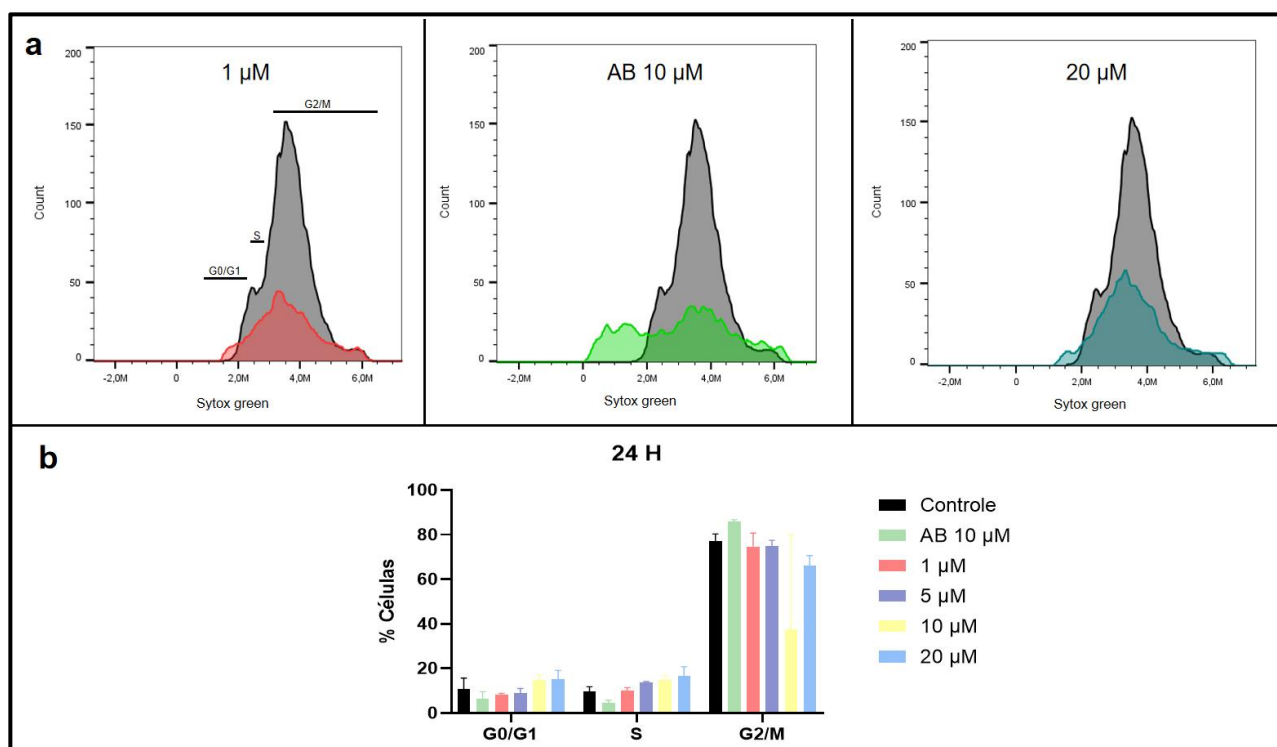
1343

Para avaliar se alterações no ciclo celular estariam ocorrendo, os trofozoítos foram expostos a 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M do composto sal sódico do ácido nalidíxico durante 24 h e 48 h de tratamento. Após 24 h, a cultura controle exibia 10,7% de células na fase G0/G1, 13,99% de células na

1344 fase S e 77,18% de células na fase G2/M (**Fig. 13a-b**). Como pode ser  
 1345 observado na **figura 13a**, após a administração do composto houve uma  
 1346 discreta diminuição de células na fase G2/M e um leve aumento nas fases S e  
 1347 G0/G1 apenas nas maiores concentrações. Os parasitos tratados com 10  $\mu\text{M}$   
 1348 exibiram uma porcentagem de células na fase G0/G1 de 14,98%, S de 14,09%  
 1349 e G2/M de 69,03%. Já os tratados com 20  $\mu\text{M}$  exibiram uma porcentagem de  
 1350 células na fase G0/G1 de 15,24%, S de 16,8% e G2/M de 66,08% (**Fig. 13**).

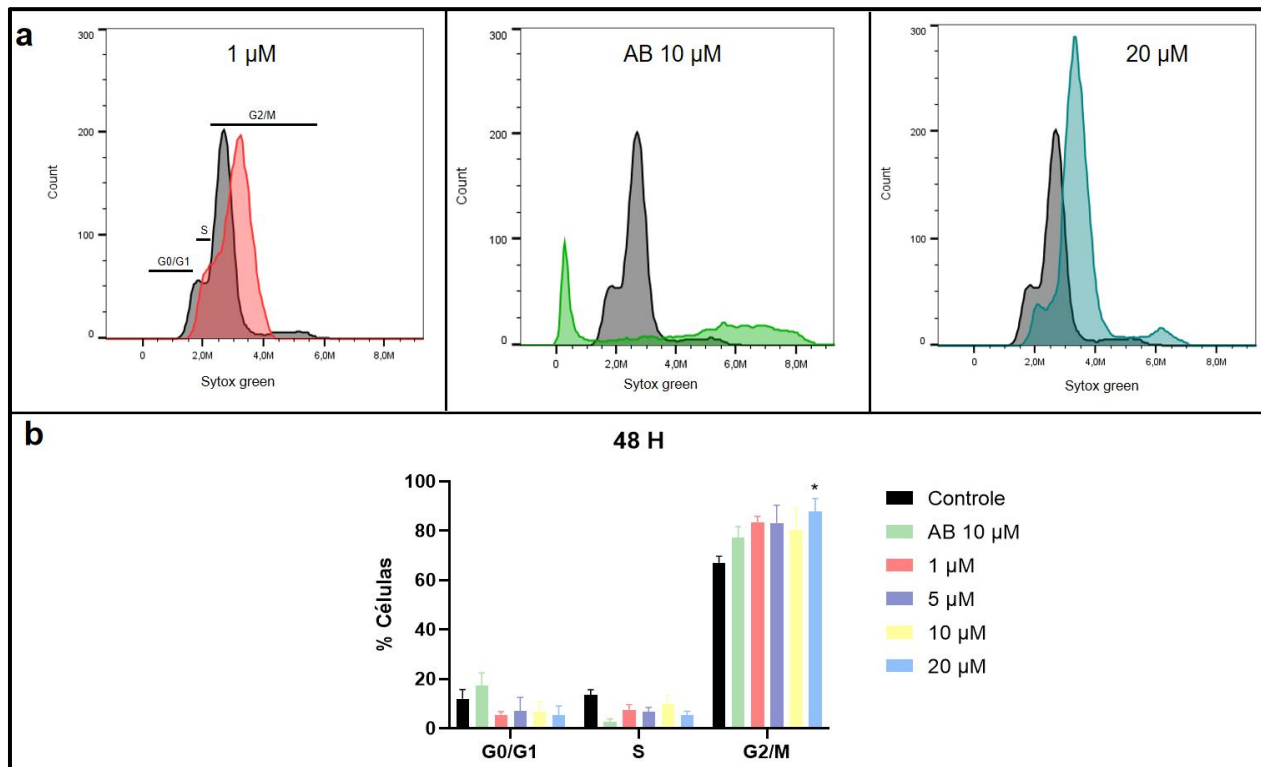
1351 Em 48 h, a cultura controle exibiu 12% de células na fase G0/G1, 13,55%  
 1352 na fase S, e 67,10% na fase G2/M (**Fig. 14a-b**). Em comparação, os trofozoítos  
 1353 tratados com o composto exibiram um aumento na fase G2/M, acompanhado de  
 1354 uma redução nas fases S e G0/G1 em todas as concentrações testadas. A  
 1355 maior alteração foi observada na concentração de 20  $\mu\text{M}$  que apresentou 5,46%  
 1356 de células nas fases G0/G1 e S, e 87,76% de células acumuladas em G2/M  
 1357 (**Fig. 14b**). Como controle positivo, o albendazol também induziu um acúmulo  
 1358 significativo de células em G2/M.

1359



1360 **Figura 13. Ciclo celular de trofozoítos de *G. intestinalis* em 24 h. (a)** Histogramas  
 1361 representativos do ciclo celular em culturas controle (preto) e tratadas com 1  $\mu\text{M}$

1362 (vermelho), AB 10  $\mu\text{M}$  (verde) e 20  $\mu\text{M}$  (azul) de sal sódico do ácido nalidíxico. **(b)** A  
 1363 porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M é observada para cada condição.  
 1364 (N = 2).  
 1365



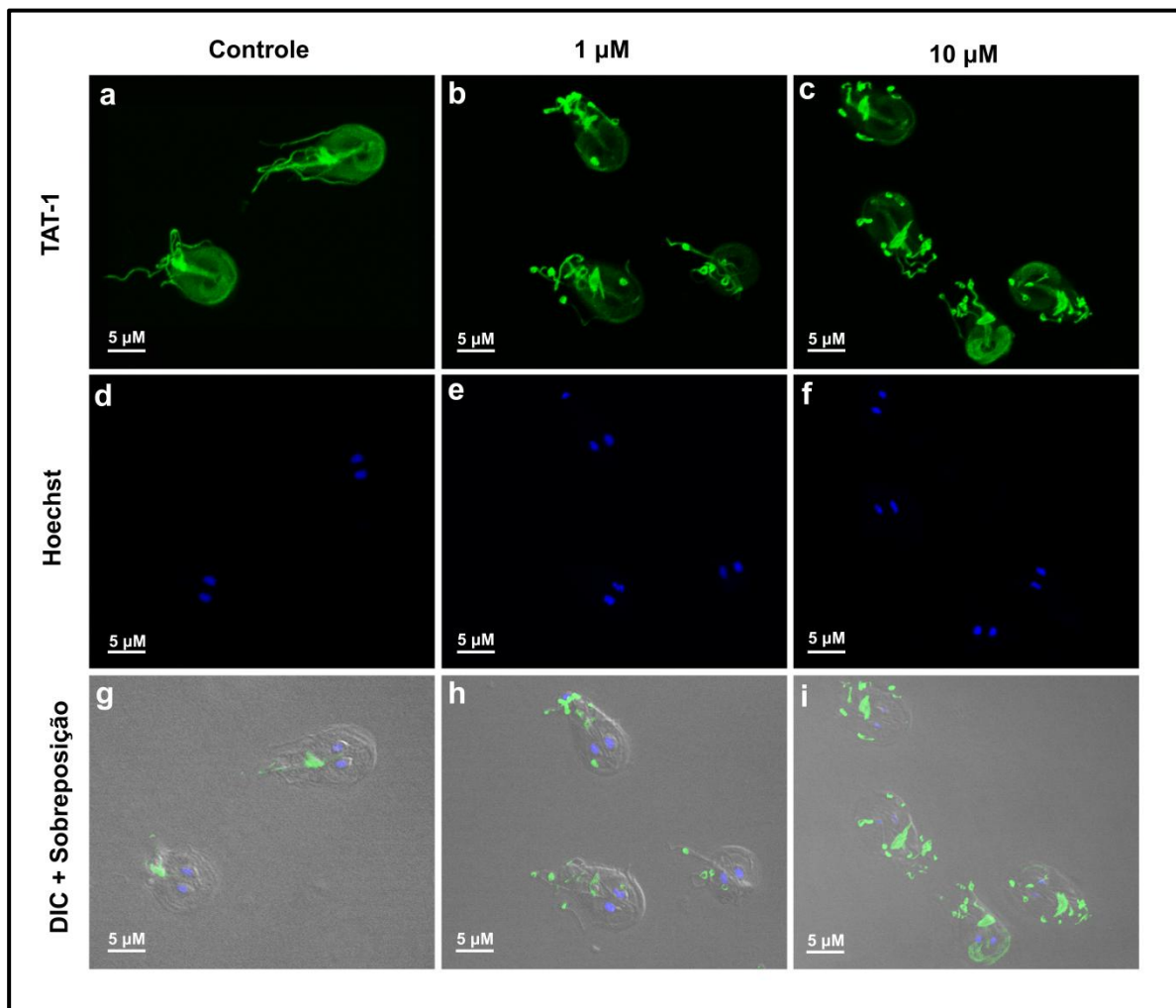
1366 **Figura 14. Ciclo celular de trofozoítos de *G. intestinalis* em 48 h.** (a) Histogramas  
 1367 representativos do ciclo celular em culturas controle (preto) e tratadas com 1  $\mu\text{M}$   
 1368 (vermelho), AB 10  $\mu\text{M}$  (verde) e 20  $\mu\text{M}$  (azul) de sal sódico do ácido nalidíxico. **(b)** A  
 1369 porcentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M é observada para cada condição.  
 1370 Note que o aumento em G2/M na concentração de 20  $\mu\text{M}$  é significativo. (N = 3. \* = p  
 1371 <0,0001).

1372

## 1373 5.5. Imunofluorescência

1374 Para investigar se o sal sódico do ácido nalidíxico influenciaria os  
 1375 componentes do citoesqueleto dos trofozoítos, foram conduzidos ensaios de  
 1376 imunofluorescência utilizando-se o anticorpo anti-alfa-tubulina TAT-1. Na  
 1377 **Figura 15a**, observam-se células controle após 48 horas de cultivo, nas quais a  
 1378 marcação com o anticorpo anti-alfa-tubulina evidencia sua presença nos  
 1379 flagelos, no disco ventral e no corpo mediano. A partir do tratamento com 1  $\mu\text{M}$   
 1380 do composto, os flagelos apresentaram-se mais curtos, (**Fig. 15b**, **Fig. 16**)  
 1381 condição que se manteve nas concentrações mais elevadas (**Fig. 15c**).

1382



1383 **Figura 15. Imunofluorescência de *G. intestinalis* usando anticorpo TAT-1 em 48 h.**  
 1384 **(a-d-g)** Trofozoítos controle. **(b-e-h)** Trofozoítos tratados com 1  $\mu\text{M}$  de sal sódico do  
 1385 ácido nalidíxico. **(c-f-i)** Trofozoítos tratados com 10  $\mu\text{M}$  de sal sódico do ácido nalidíxico.  
 1386 O Hoechst foi utilizado para marcação do núcleo (azul). TAT-1: verde.

1387

1388

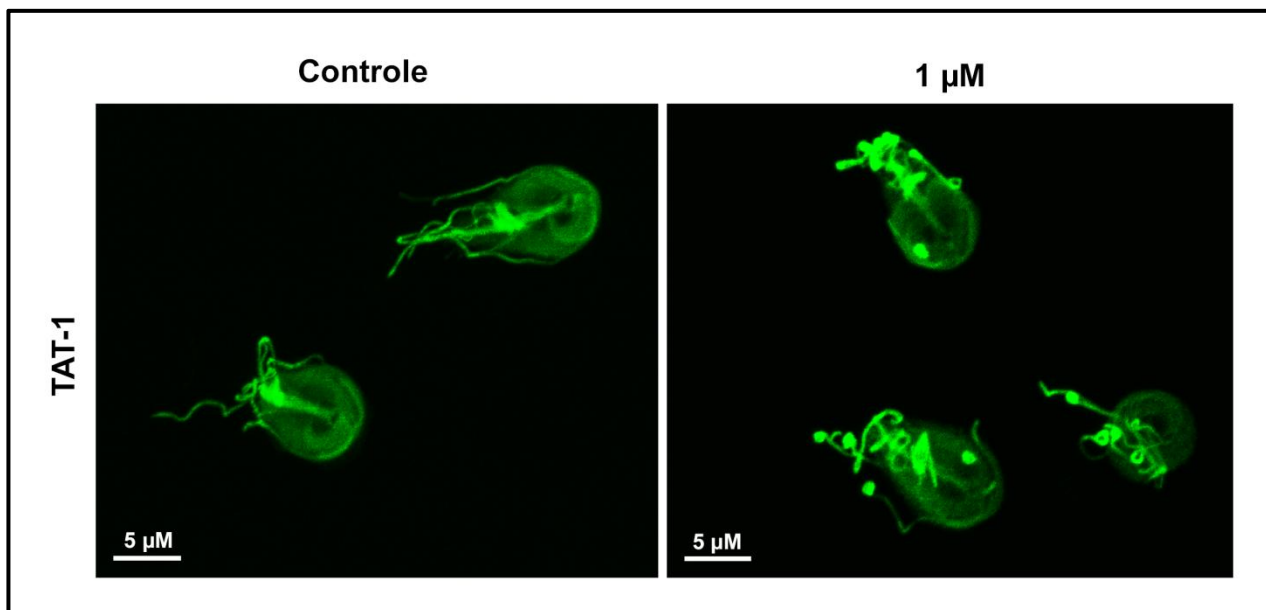
1389

1390

1391

1392

1393



1394 **Figura 16 -** Imunofluorescência de *G. intestinalis* usando anticorpo TAT-1. **Maior**  
 1395 **aumento das imagens 11a-b.** Células da cultura controle, e células tratadas com 1 µM  
 1396 de sal sódico do ácido nalidíxico. Verde: TAT-1.

1397

## 1398 5.6. Efeitos na ultraestrutura de superfície

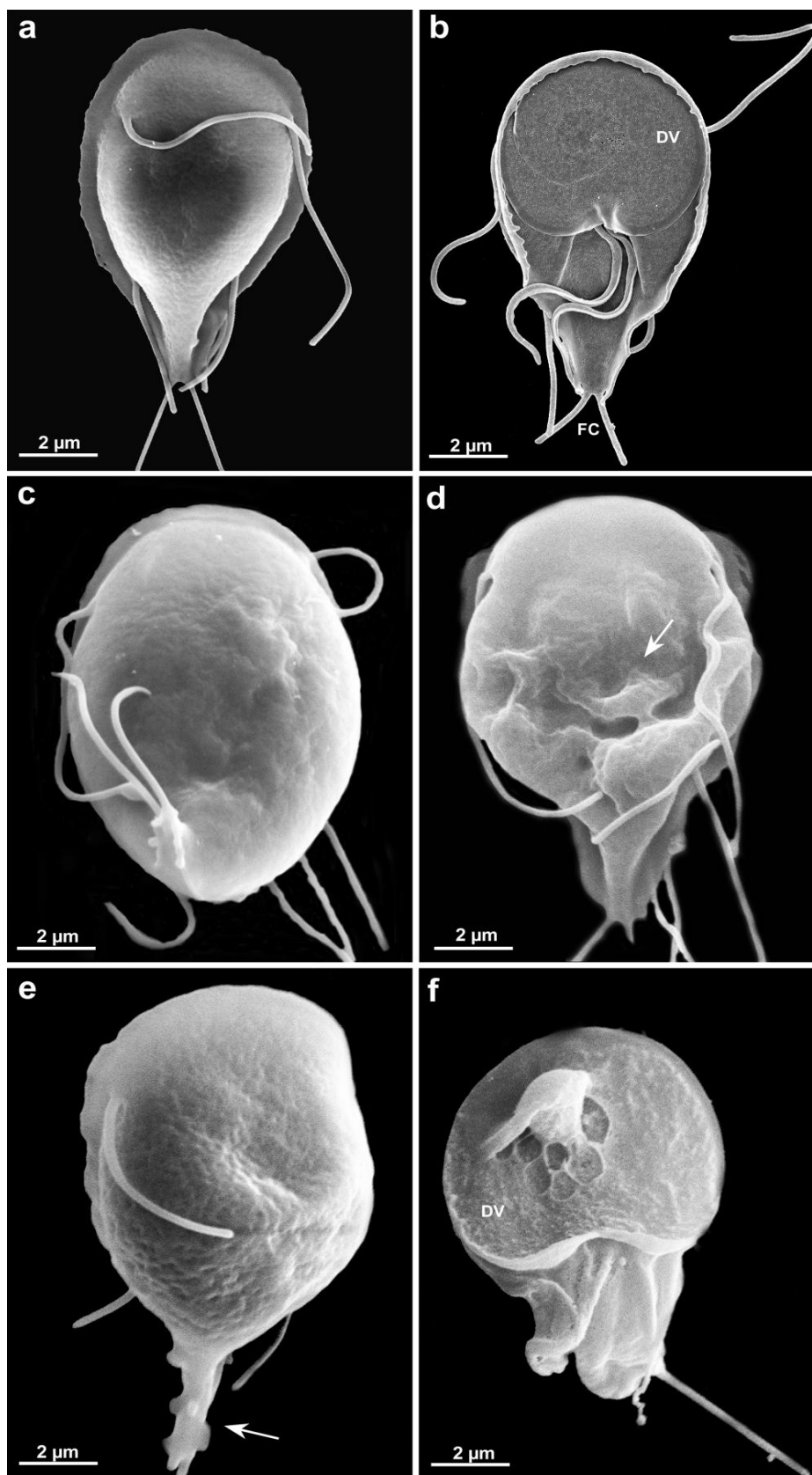
1399 A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar  
 1400 possíveis alterações na superfície do parasito após o tratamento com os  
 1401 compostos. Em seguida, foram analisadas culturas tratadas com 1 µM, 5 µM, 10  
 1402 µM e 20 µM por 48 horas. Esse tempo foi escolhido porque efeitos significativos  
 1403 na inibição da proliferação foram observados a partir desse período, permitindo  
 1404 monitorar as alterações iniciais induzidas pelos compostos.

1405 Conforme mostrado na **Figura 17**, os trofozoítos do grupo controle  
 1406 apresentaram morfologia característica, com corpo em forma de pera, quatro  
 1407 pares de flagelos, membrana plasmática preservada, disco ventral íntegro e  
 1408 flange ventro-lateral contínua (**Fig. 17a-b**). Em comparação ao controle (**Fig.**  
 1409 **17b**), trofozoítos expostos a 1 µM do sal sódico do ácido nalidíxico,  
 1410 apresentaram alterações discretas. A tendência ao encurtamento da porção  
 1411 caudal, conferindo-lhes um aspecto levemente arredondado foi observado em  
 1412 28% dos parasitos tratados (**Fig. 17c**). Após a incubação com 5 µM do  
 1413 composto, foram observadas rugosidades na superfície celular e a redução no  
 1414 tamanho dos flagelos em células com o aspecto levemente arredondado (**Fig.**  
 1415 **17d**). Essas alterações tornaram-se progressivamente mais evidentes com o

1416 aumento da concentração (10–20  $\mu\text{M}$ ), incluindo uma aparente redução tanto no  
1417 tamanho quanto na quantidade de flagelos externalizados. (**Figs. 17e–f**). Esse  
1418 efeito foi observado em 50% dos parasitos tratados com 10  $\mu\text{M}$  e em 70% dos  
1419 trofozoítos tratados com 20  $\mu\text{M}$  do sal de sódio do ácido nalidíxico (**Fig. 18**).  
1420 Áreas de extração da membrana foram observadas após tratamento com 20  $\mu\text{M}$   
1421 (**Fig. 17f**). A porcentagem de células em divisão, identificadas pela morfologia  
1422 característica em forma de “coração”, não diferiu entre os grupos controle e  
1423 tratados (**Fig. 18**), sendo em torno de 4% nas culturas.

1424         As células tratadas com enoxacina nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$   
1425 (**Fig. 19a-b**) também exibiram uma tendência a redução no tamanho e na  
1426 quantidade de seus flagelos, além de apresentarem uma aparente retração da  
1427 região caudal do parasito. Entretanto, a região anterior foi ainda identificada  
1428 contendo o disco ventral íntegro (**Fig. 19b**).

1429  
1430  
1431  
1432  
1433  
1434  
1435  
1436  
1437  
1438  
1439  
1440  
1441  
1442  
1443  
1444  
1445  
1446  
1447  
1448  
1449  
1450  
1451  
1452



1453 **Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura do trofozoíto de *G.***  
1454 ***intestinalis* tratados e não tratados, em 48 h. (a) Superfície dorsal do trofozoíto**  
1455 **e posição ventral (b). (c) Trofozoíto tratado com 1 μM de ácido nalidíxico. (d)**  
1456 **Parasito tratado com 5 μM do composto apresenta aspecto irregular da superfície**  
1457 **dorsal (seta). (e) A diminuição do número de flagelos é nítida após o tratamento**

1458 com 10  $\mu\text{M}$ . Note a região caudal modificada (seta). **(f)** A superfície  
 1459 correspondente ao disco ventral apresenta áreas com extração da membrana  
 1460 após tratamento com 20  $\mu\text{M}$ . **DV** - Disco ventral; **FC** – Flagelo caudal.

1461

1462

1463

1464

1465

1466

1467

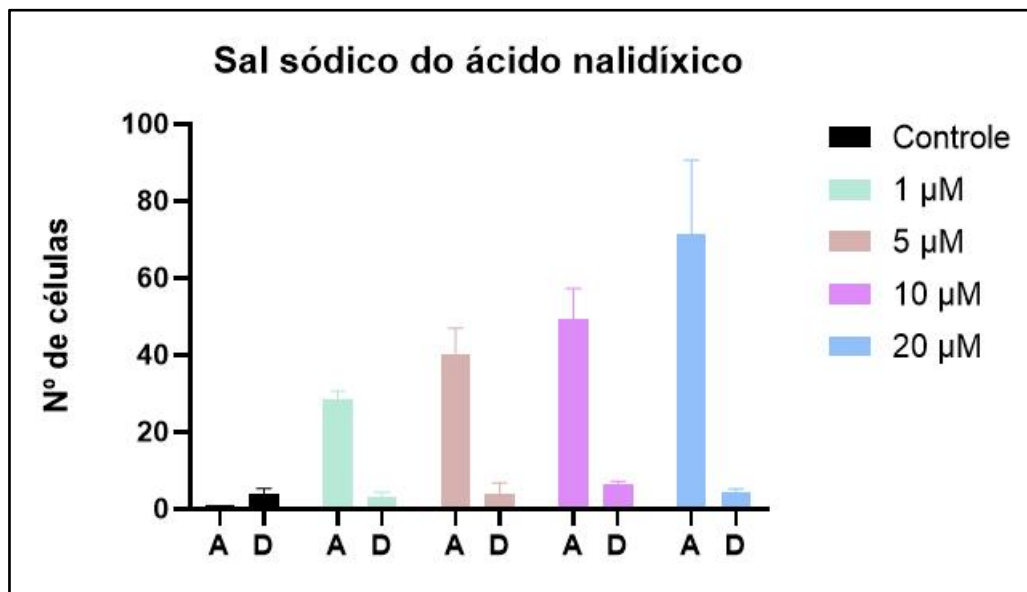
1468

1469

1470

1471

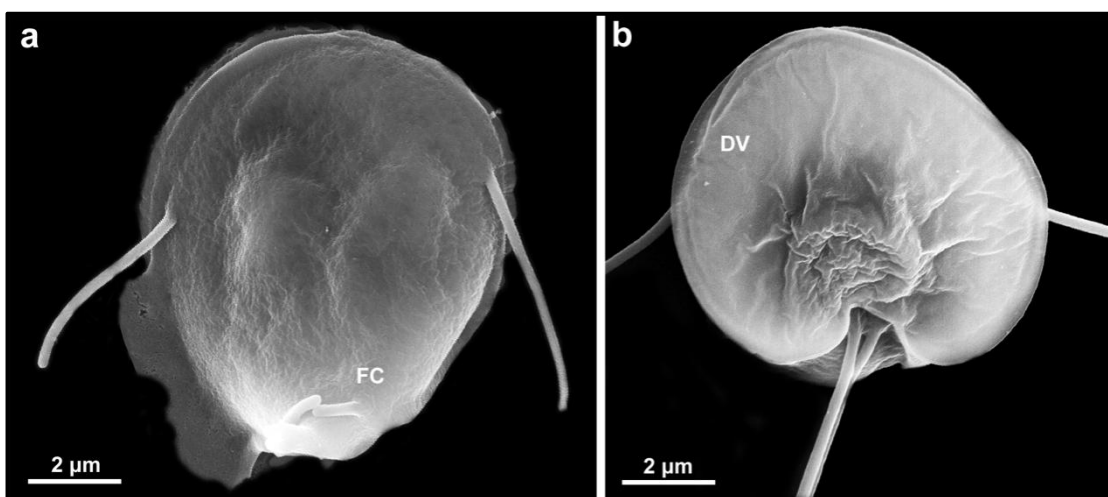
1472



1473

1474 **Figura 18. Quantificação de células arredondadas com alterações nos flagelos (A)**  
 1475 **e de células em divisão (D) em imagens de microscopia eletrônica de varredura.**  
 1476 Foram contadas 100 células em cada condição nos grupos controle e tratados com sal  
 1477 sódico do ácido nalidíxico por 48 h. N = 2 experimentos independentes.

1478



1479

1480 **Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do trofozoíto de *G. intestinalis***  
 1481 **tratados com enoxacina por 48 h. (a) Trofozoítos tratados com 10  $\mu\text{M}$ , apresentando**  
 1482 **retração da sua porção caudal, com redução dos flagelos externalizados. (b)**  
 1483 **Trofozoítos tratados com 20  $\mu\text{M}$ . O formato do disco ventral (DV) se encontra alterado,**

1484 com enrugões, e o corpo da célula não é visível. **DV** - Disco ventral; **FC** – Flagelo  
1485 caudal.

### 1486 **5.7. Caracterização do citoesqueleto**

1487 Para avaliar a integridade do citoesqueleto, mais precisamente dos  
1488 flagelos, utilizamos o protocolo para extração de membrana. As **Figuras 20a-b**  
1489 mostram os elementos do citoesqueleto como os microtúbulos que compõem o  
1490 disco ventral e o *funis*. Os axonemas dos flagelos são também observados.  
1491 Após tratamento com 1-5  $\mu$ M do composto sal sódico do ácido nalidíxico, nota-  
1492 se que os axonemas dos flagelos estão mais próximos ao corpo da célula  
1493 estando coberto por filamentos citoplasmáticos (**Figs. 20c-d**). O  
1494 comprometimento do *funis*, localizado na região caudal da célula, é também  
1495 observado. Os microtúbulos que compõem esta estrutura são vistos rompidos e  
1496 o espaçamento maior entre cada um deles é também notado (**Figs. 20e-f**)  
1497 quando comparado ao da célula controle (**Fig. 20b**).

1498

1499

1500

1501

1502

1503

1504

1505

1506

1507

1508

1509

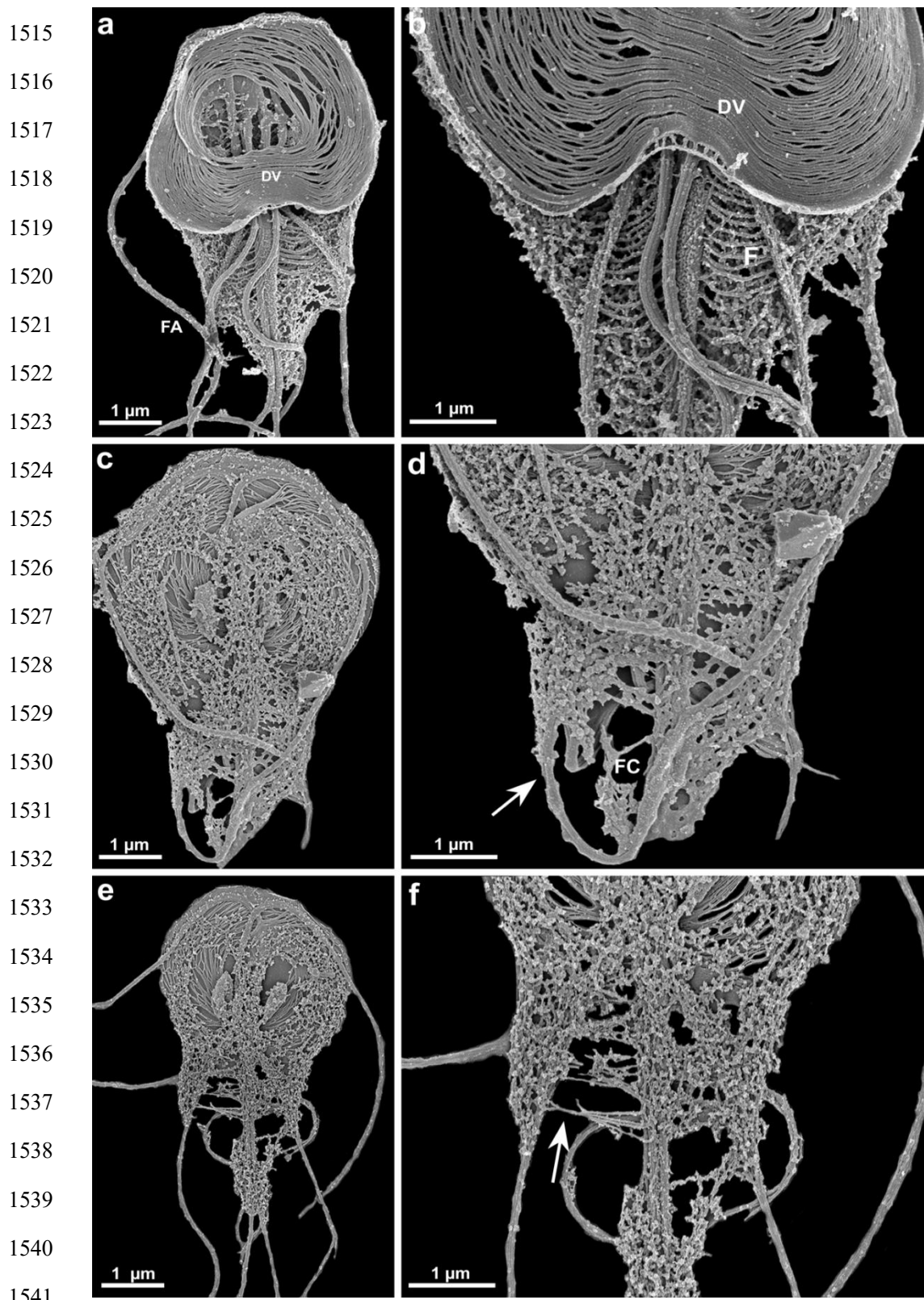
1510

1511

1512

1513

1514



**20. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução do citoesqueleto de *G. intestinalis* em 48 h.** (a-b) Controle: superfície ventral do trofozoíto. Os microtúbulos do disco ventral (DV) e do funis (F) estão íntegros. Observe o flagelo anterior (FA). (c-d) Trofozoítos tratados com 1 $\mu$ M. A ponta do flagelo anterior está curvada e coberta por

1546 filamentos (seta). **(e-f)** Trofozoítos tratados com 5  $\mu\text{M}$  mostram microtúbulos do funis  
1547 rompidos (seta). **DV**- Disco ventral; **FA**- Flagelo anterior; **FC**- Flgelo caudal; **F**- Funis.

### 1548 **5.8. Avaliação da ultraestrutura intracelular**

1549

1550 A MET foi usada para observar possíveis alterações nas organelas e outras  
1551 estruturas celulares do trofozoíto após o tratamento. Nestes ensaios, os parasito  
1552 s foram analisados após exposição ao sal sódico do ácido nalidíxico nas  
1553 concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  por 48 h. Este tempo foi novamente  
1554 escolhido para avaliar os efeitos primários do fármaco no parasito.

1555 A **Figura 21** mostra cortes transversais da região anterior das células  
1556 controle (sem tratamento). As principais estruturas do trofozoíto são observadas  
1557 como: os núcleos com perfil arredondado; axonemas entre ambos os núcleos;  
1558 vesículas periféricas logo abaixo da membrana plasmática; disco ventral com  
1559 microtúbulos e microfita dispostos continuamente. O citoplasma mostra  
1560 grânulos de glicogênio e ribossomos uniformemente distribuídos (**Fig. 21a**). As  
1561 mesmas características foram vistas em células onde apenas o solvente (NaOH)  
1562 estava presente (dados não mostrados). Após o tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de sal de  
1563 sódio do ácido nalidíxico, observamos ondulações na membrana da célula (**Fig.**  
1564 **21a**). A presença de vacúolos no citoplasma foi frequente a partir da  
1565 concentração de 5  $\mu\text{M}$  (**Fig. 21c-d**). No tratamento com 10  $\mu\text{M}$  do composto,  
1566 flagelos dentro de vacúolos foram observados, indicando a internalização  
1567 flagelar (**Fig. 21e-f**). Danos na estrutura 9:2+2 dos axonemas não foram  
1568 visualizados (**Fig. 21e-f**). Alterações no núcleo não foram observadas (**Figs.**  
1569 **21c-d**).

1570

1571

1572

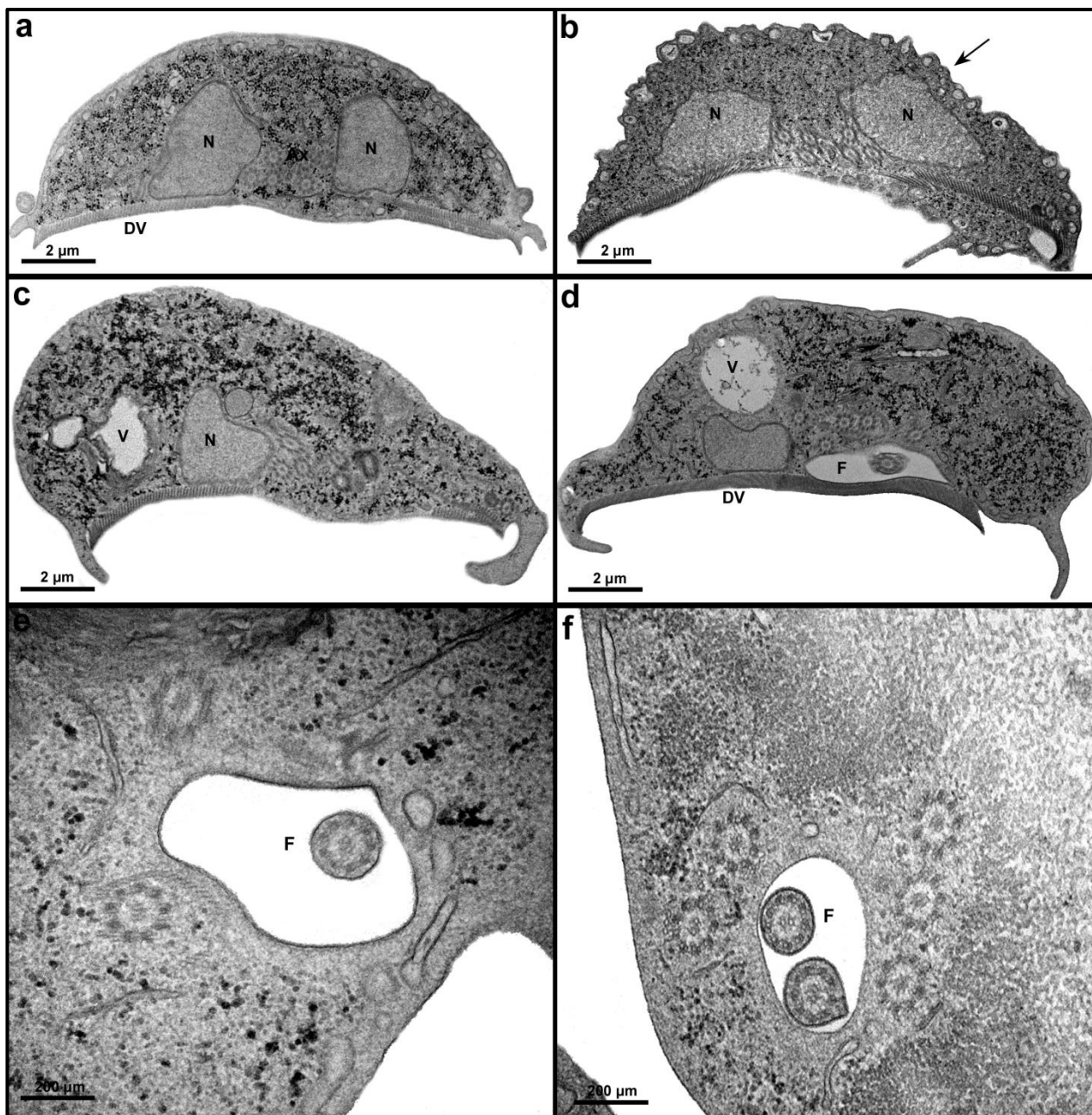
1573

1574

1575

1576

1577



1578

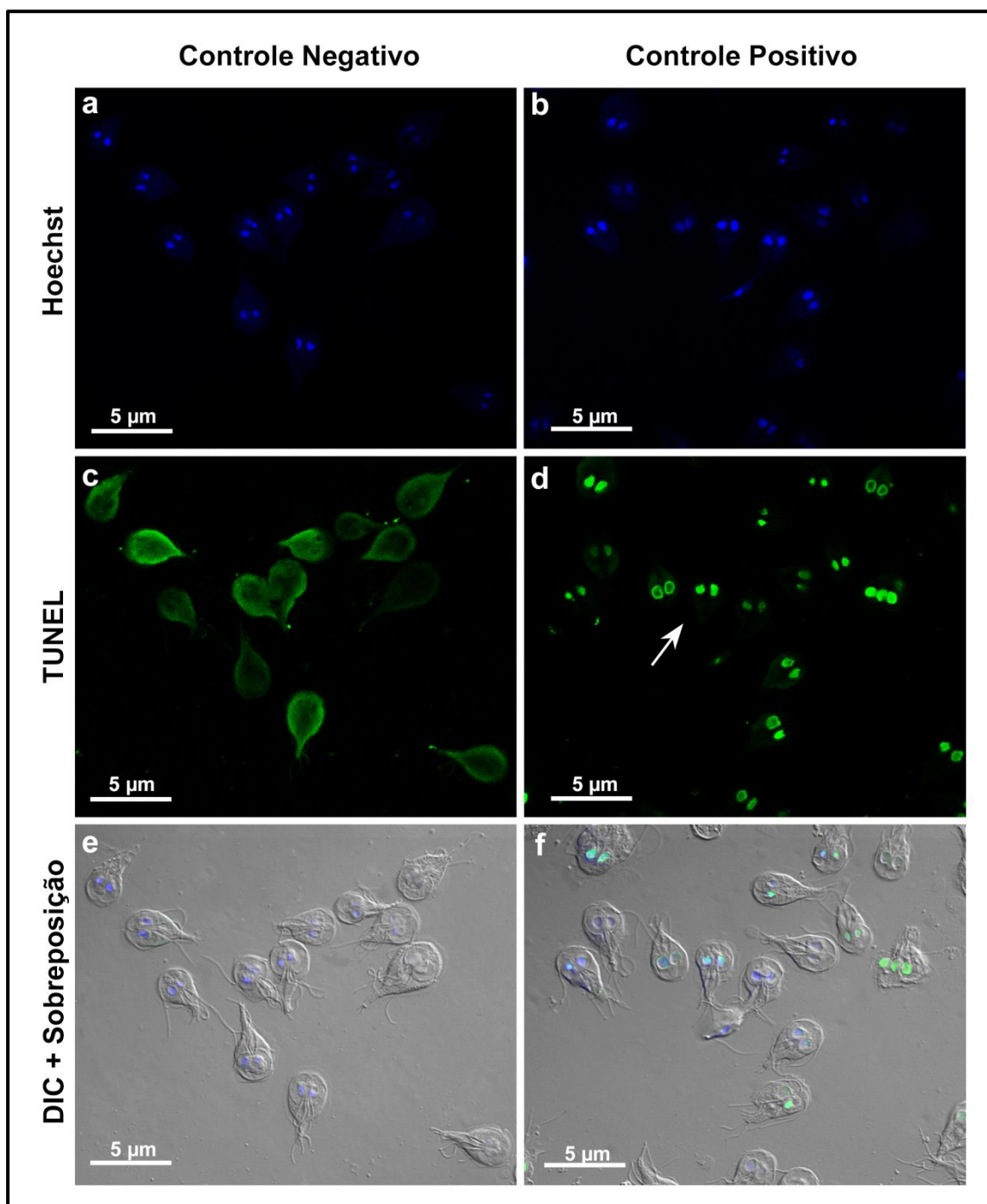
1579 **Figura 21. Trofozoítos de *G. intestinalis*.** (a) Controle. Corte transversal do parasito.  
 1580 As principais estruturas da célula são mostradas. (b) Corte transversal do parasito  
 1581 tratado com 1  $\mu$ M mostrando ondulações na membrana (seta). (c-d) Presença de  
 1582 vacúolos com material citoplasmático após a exposição do composto na concentração  
 1583 de 5 e 10  $\mu$ M. (e-f) Flagelos internalizados após tratamento com 5 e 10  $\mu$ M. **AX** -  
 1584 Axonemas; **DV** - Disco ventral; **N** - Núcleos; **F** - Flagelos; **V**- Vacúolo.

1585

### 1586 5.9. Fragmentação nuclear

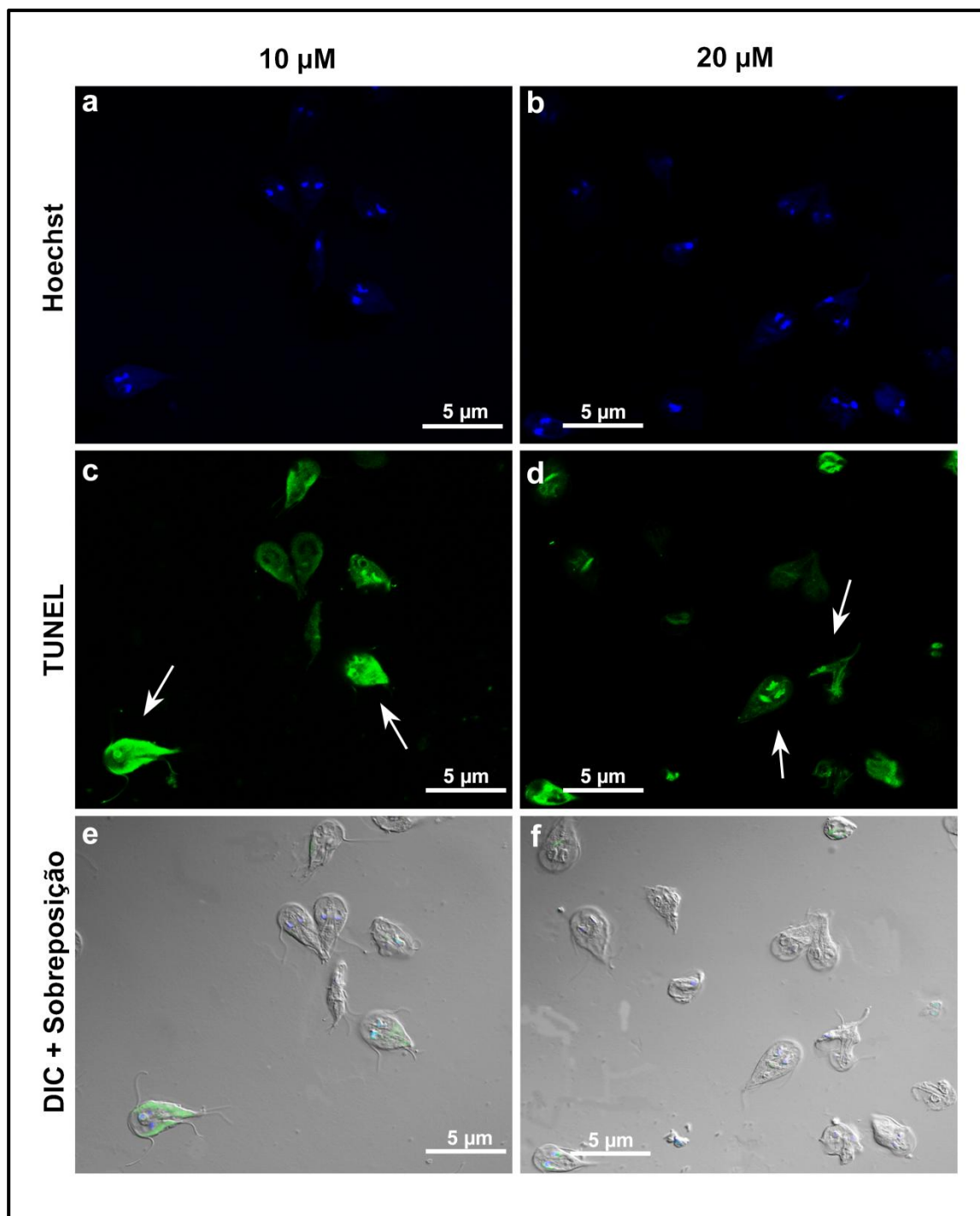
1587 Avaliamos o efeito do sal sódico do ácido nalidíxico na indução da  
 1588 fragmentação nuclear em trofozoítos de *G. intestinalis*, considerando que estes

1589 compostos tem potencial para causar danos ao DNA em outros modelos  
1590 celulares. Conforme ilustrado na Figura 22, nenhuma marcação foi observada  
1591 no núcleo das células no controle negativo (**Fig. 22 a,c,e**). Já no controle  
1592 positivo as células apresentaram intensa marcação nuclear (**Fig. 22 b,d,f**),  
1593 confirmando a eficácia do ensaio. Após 48 horas de tratamento, células  
1594 positivas para TUNEL foram observadas após exposição à concentração de 10  
1595  $\mu\text{M}$  (8%) e 20  $\mu\text{M}$  (42%) (**Fig. 23a-f**, **Fig. 24**).



1596 **Figura 22. Avaliação da fragmentação nuclear. (a-c-e)** Células sem tratamento  
1597 (controle negativo), sem fragmentação. **(b-d-f)** Controle positivo do Kit TUNEL, com  
1598 marcação no núcleo das células (verde). O Hoechst foi utilizado para marcação do  
1599 núcleo (azul).

1600



1601

1602 **Figura 23. Avaliação da fragmentação nuclear (TUNEL) em células tratadas com**  
1603 **sal sódico do ácido nalidíxico em duas concentrações. (a-c-e)** Trofozoítos tratados  
1604 com 10 μM e com 20 μM **(b-d-e)**. Observe a marcação de fragmentação nuclear em

1605 verde no núcleo das células (seta). O Hoechst foi utilizado para marcação do núcleo  
1606 (azul).

1607

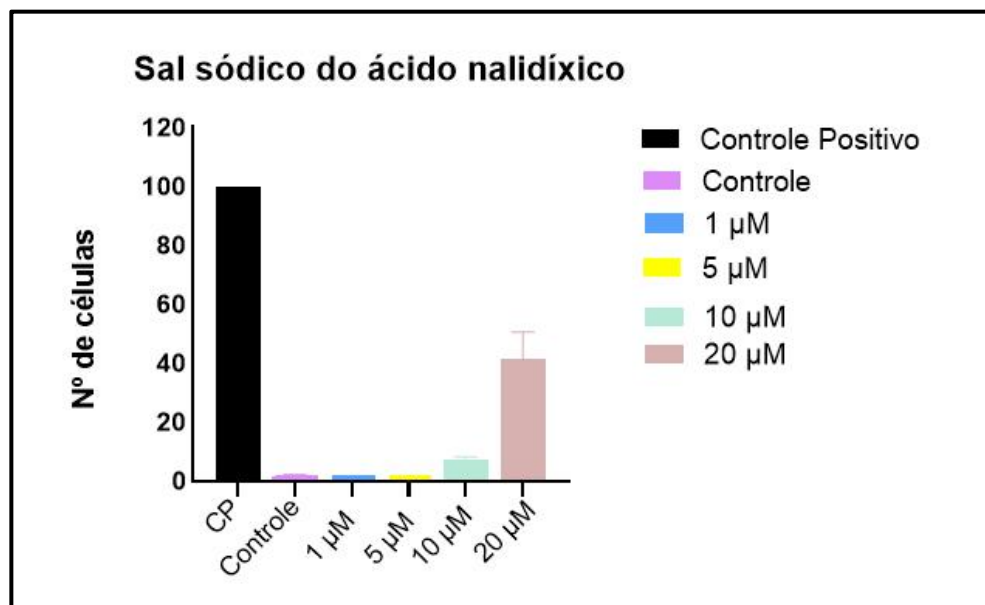
1608

1609

1610

1611

1612



1613 **Figura 24. Quantificação de células com fragmentação nuclear em**  
1614 **imunofluorescência.** Foram contadas 100 células nos grupos controle e tratados  
1615 com sal sódico do ácido nalidíxico por 48 h. (N=2 experimentos independentes).

1616

### 1617 5.10. Imunofluorescência para identificação do encistamento/cistos

1618 Para verificar se o composto poderia induzir o encistamento, realizamos a  
1619 marcação das células com anticorpos anti-CWP1, uma proteína específica da  
1620 parede cística. A **Figura 25a-b** apresenta cistos de *G. intestinalis* marcados com  
1621 anti-CWP1. No entanto, as células tratadas com o sal sódico do ácido nalidíxico  
1622 não apresentaram marcação para essa proteína (**FIG.25 c-d**) em nenhuma das  
1623 concentrações testadas.

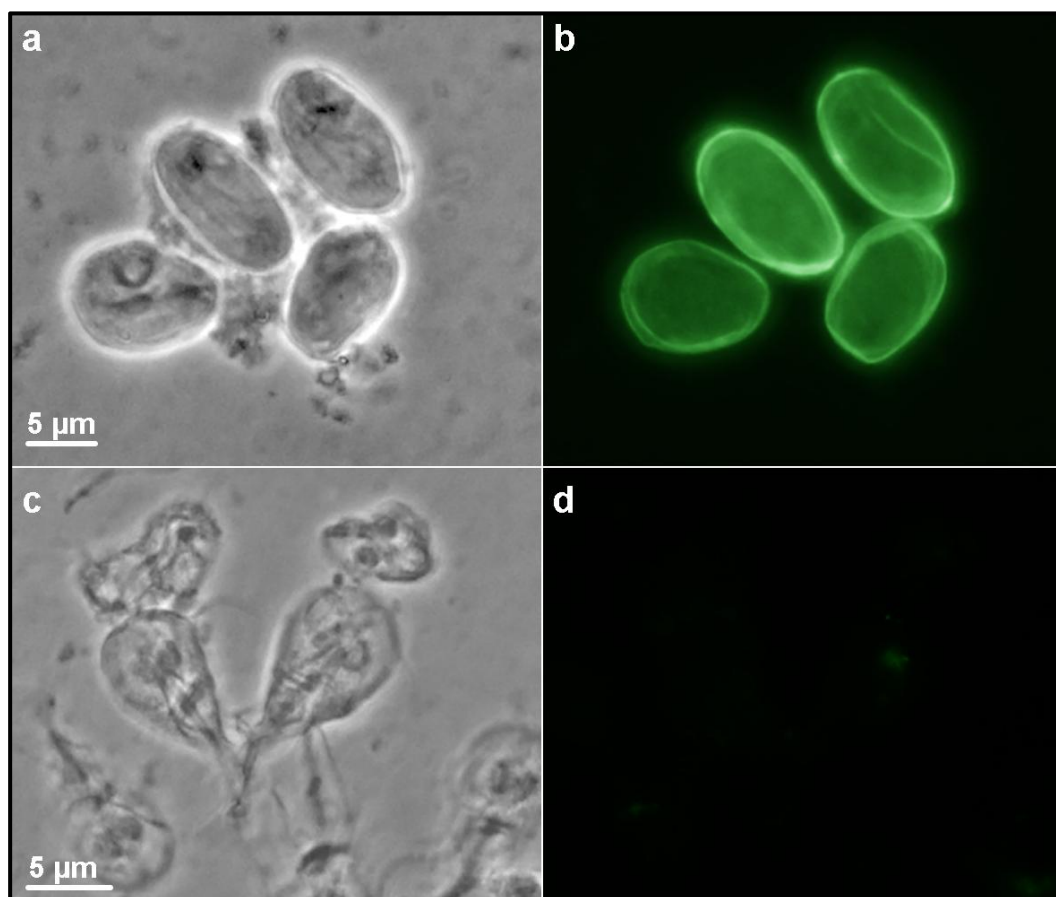
1624

1625

1626

1627

1628



1629

1630 **Figura 25. Imunofluorescência de *G. intestinalis* usando anticorpo anti- CWP1.**  
 1631 **(a-b).** Cisto de *G. intestinalis*. **(c-d)** Trofozoítos tratados com 5 µM de sal sódico do  
 1632 ácido nalidíxico. Verde: CWP-1.

1633

#### 1634 **5.11. Avaliação da toxicidade em células epiteliais intestinais humanas** 1635 **(Caco-2)**

1636 Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para avaliar o efeito dos  
 1637 compostos sal sódico do ácido nalidíxico e enoxacina em células epiteliais  
 1638 intestinais humanas (*Caco-2*). Nesse contexto, a atividade metabólica das  
 1639 células nas culturas tratadas e não-tratadas foi avaliada após 72 h de  
 1640 tratamento utilizando-se as concentrações de 10 µM, 20 µM, 50 µM e 100 µM  
 1641 **(FIG. 26a-b)**. O metronidazol na concentração de 10 µM foi utilizado como  
 1642 fármaco de escolha para comparação. O NaOH (0,2M) e o formaldeído 4%  
 1643 foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, nos  
 1644 mesmos tempos. Como pode ser observado na **Figura 26a**, o tratamento com  
 1645 as concentrações de 10 µM e 20 µM de sal sódico do ácido nalidíxico não  
 1646 interferiu na viabilidade das células intestinais humanas ( $p < 0,0001$ ), enquanto

1647 nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , essa redução se mostrou significativa ( $p$   
 1648  $<0,0001$ ). A  $\text{CC}_{50}$  obtida foi de 270,8  $\mu\text{M}$ . Devido a isso, calculamos o índice de  
 1649 seletividade para determinar a eficácia do composto contra o parasito (IS=  
 1650  $270,8 / 4.3$ ). O resultado obtido foi de aproximadamente 62,97, indicando que  
 1651 esse composto é mais seletivo para *G. intestinalis* do que para as células Caco-  
 1652 2. A enoxacina (**Fig. 26b**) não interferiu na atividade metabólica das células  
 1653 intestinais de forma significativa em nenhuma das concentrações testadas.

1654

1655

1656

1657

1658

1659

1660

1661

1662

1663

1664

1665

1666

1667

1668

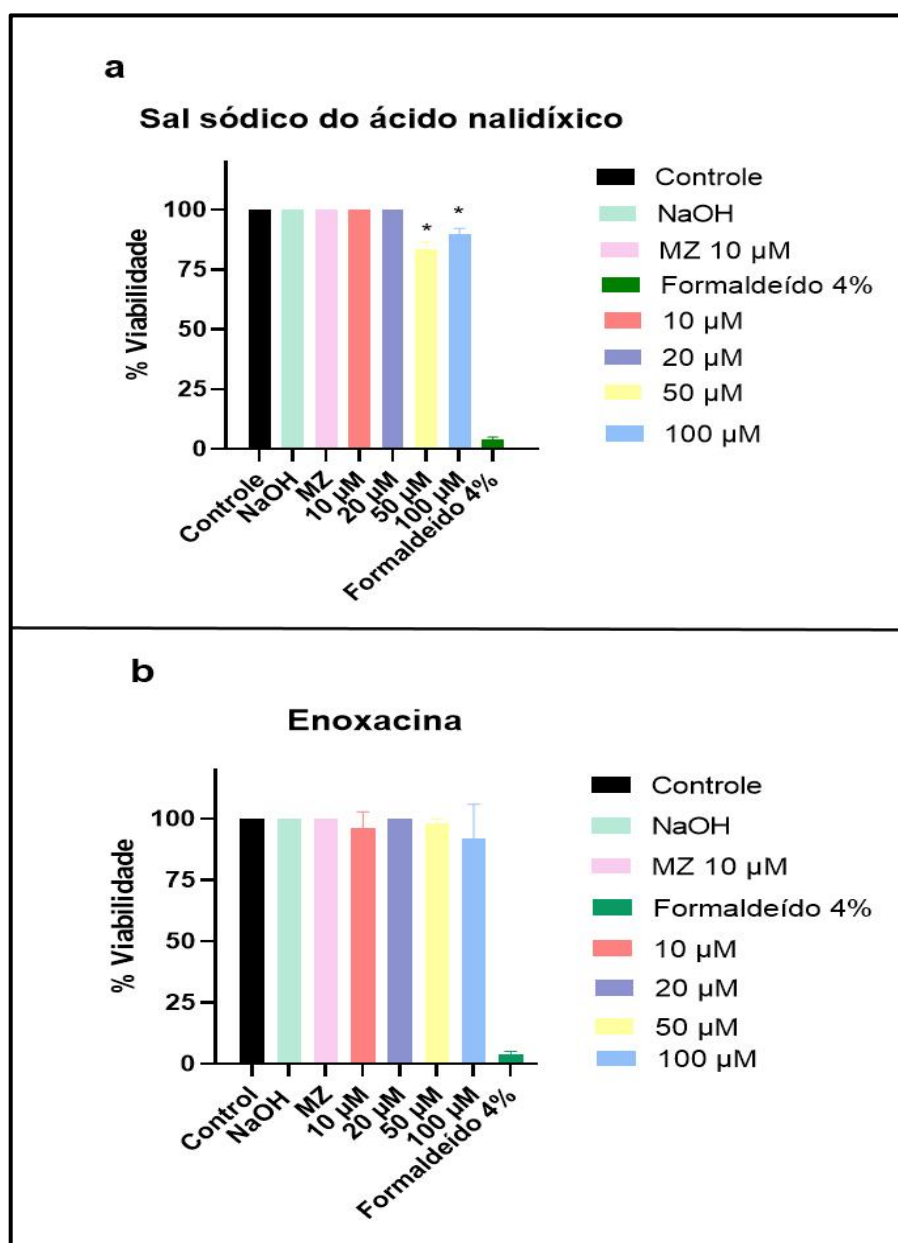
1669

1670

1671

1672

1673



1674 **Figura 26. Citotoxicidade em células Caco-2 em 72 h. (a)** Células tratadas com sal  
 1675 sódico do ácido nalidíxico. **(b)** Células tratadas com enoxacina. (N = 3, \* =  $p <0,0001$ ).

1676

## 1677 6. DISCUSSÃO

1678 Embora o tratamento da giardíase seja, em geral eficaz, os fármacos  
1679 disponíveis apresentam diversas limitações, incluindo a ocorrência de efeitos  
1680 adversos e o aumento progressivo da resistência do parasito a essas  
1681 substâncias (LEITSCH, 2015). O metronidazol, classificado pela Organização  
1682 Mundial da Saúde (OMS) como um “medicamento essencial”, foi incluído no  
1683 13º relatório sobre carcinógenos do *National Institutes of Health* (NIH, EUA)  
1684 devido à sua capacidade de induzir tumores em camundongos quando  
1685 administrado em doses elevadas (LEITSCH, 2015). Como alternativa  
1686 terapêutica de segunda linha, utiliza-se o albendazol, um carbamato de  
1687 benzimidazol, cuja efetividade torna-se variável quando utilizado em dose  
1688 única, regime frequentemente adotado na prática clínica (AW *et al.*, 2019).  
1689 Além disso, a *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) recomenda  
1690 precaução no uso desse fármaco em mulheres em idade fértil, pois há  
1691 evidências de seu potencial teratogênico. Considerando os efeitos adversos  
1692 mencionados e a crescente resistência do parasito aos fármacos atualmente  
1693 empregados — os quais vêm sendo utilizados na prática clínica há mais de  
1694 cinco décadas —, torna-se imprescindível a realização de novos estudos  
1695 voltados à identificação de potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da  
1696 giardíase.

1697 Atualmente, diversos estudos investigam fármacos capazes de inibir  
1698 processos celulares essenciais, como a transcrição e replicação do DNA. Entre  
1699 as classes de compostos quimioterápicos que vêm ganhando destaque,  
1700 encontram-se os inibidores de topoisomerases. As topoisomerases  
1701 desempenham um papel central na maioria dos processos celulares, pois a  
1702 maior parte das atividades que requerem acesso à informação genética  
1703 armazenada no DNA exige a separação temporária ou permanente das fitas  
1704 da dupla hélice. Essas enzimas desempenham um papel essencial na  
1705 preparação dos cromossomos replicados para a segregação e divisão celular.  
1706 (BUZUN *et al.*, 2020). No contexto de *G. intestinalis*, organismo modelo deste  
1707 estudo, a relação entre a atividade das topoisomerases e o processo de  
1708 encistamento já foi demonstrada. Estudos mostraram que a expressão da

1709 topoisomerase II aumenta durante esse processo, e sua superexpressão induz  
1710 a ativação dos genes CWP1-3 e myb2 (Lin *et al.*, 2013; 2017).

1711 Nos últimos anos, diversos estudos foram conduzidos utilizando  
1712 inibidores de topoisomerasas em protozoários. No caso de *G. intestinalis*,  
1713 embora com concentrações maiores que as testadas aqui, a quinolona  
1714 ciprofloxacina demonstrou um efeito citotóxico que parece levar à morte celular  
1715 por necrose (SOUSA & SILVA, 2001). Em *Leishmania donovani*, esses  
1716 inibidores foram capazes de induzir a interrupção do ciclo celular, culminando  
1717 no desencadeamento do processo apoptótico (MITTRA *et al.*, 2000). Já em  
1718 *Trypanosoma cruzi*, os inibidores de topoisomerase comprometeram  
1719 significativamente a proliferação do parasito, provocando a interrupção do ciclo  
1720 celular, alterações ultraestruturais e danos no DNA nas formas epimastigotas  
1721 (ZUMA *et al.*, 2014). Diante desse contexto, a utilização de inibidores de  
1722 topoisomerasas apresenta-se como uma estratégia promissora, não apenas  
1723 para elucidar o papel biológico dessas enzimas nos protozoários, mas também  
1724 como uma abordagem potencial terapêutica para o combate das infecções  
1725 causadas.

1726 É importante dizer que o reposicionamento de fármacos, que busca  
1727 novas aplicações para medicamentos já aprovados, é uma estratégia  
1728 promissora na identificação de tratamentos para diversas doenças. Essa  
1729 abordagem é especialmente relevante para Doenças Tropicais Negligenciadas  
1730 (DTNs), que carecem de recursos e opções terapêuticas eficazes (FERREIRA  
1731 & ANDRICOPULO, 2016). No contexto das topoisomerasas II, o  
1732 reposicionamento de seus inibidores tem sido explorado como uma estratégia  
1733 promissora para o tratamento de doenças infecciosas negligenciadas, como a  
1734 tripanossomíase africana humana (DIAS, 2014). Com base no exposto, o  
1735 presente estudo investigou os efeitos de inibidores de topoisomerase,  
1736 especificamente o sal sódico do ácido nalidíxico (inibidor da DNA girase  
1737 bacteriana e topoisomerase II), a enoxacina (inibidor de topoisomerase II) e a  
1738 norfloxacina (também inibidor de topoisomerase II) em *G. intestinalis*.

1739 A escassez de estudos sobre inibidores de topoisomerase em *G.*

1740 *intestinalis* torna este estudo estratégico. Em nossas análises mostramos  
1741 que, entre os três compostos testados, o uso do sal sódico do ácido nalidíxico  
1742 demonstrou a maior eficácia na redução da proliferação dos trofozoítos,  
1743 apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 8,8 µM (48 h) e 4,3 µM (72 h). Em outros  
1744 protozoários, como *Plasmodium falciparum*, os inibidores de topoisomerase  
1745 apresentaram IC<sub>50</sub> variando entre 4,5 e 142,9 µg/mL (TAN *et al.*, 2021). No  
1746 caso de *T. cruzi*, a enoxacina (mesma substância utilizada neste estudo) foi  
1747 capaz de inibir em 50% a proliferação de epimastigotas quando comparada às  
1748 células controle após tratamento com 163,64 µM do fármaco por 48 h (ZUMA  
1749 *et al.*, 2011). Para a norfloxacina, em *T. cruzi*, a IC<sub>50</sub> foi de 974 µM em 48 h  
1750 (ZUMA *et al.*, 2011). Esses resultados indicam que os inibidores de  
1751 topoisomerase testados no presente estudo apresentam maior eficácia contra  
1752 *G. intestinalis* quando comparados aos efeitos observados em outros  
1753 protozoários. Assim como observado em *T. cruzi* (ZUMA *et al.*, 2011), a  
1754 enoxacina demonstrou ser mais eficaz do que a norfloxacina. No entanto, no  
1755 presente estudo, o sal sódico do ácido nalidíxico, uma quinolona de primeira  
1756 geração, revelou-se ainda mais eficaz que a enoxacina. Ao analisarmos os  
1757 resultados referentes à proliferação celular após 24 horas de tratamento,  
1758 observamos que a redução na proliferação celular foi comparável àquela  
1759 promovida pelo metronidazol, fármaco atualmente utilizado como referência  
1760 terapêutica. Esse padrão de inibição manteve-se consistente também em  
1761 tempos posteriores de exposição, especialmente nas concentrações mais  
1762 elevadas do composto avaliado. Esses achados sugerem que a substância em  
1763 estudo apresenta um desempenho citotóxico semelhante ao do metronidazol,  
1764 indicando seu potencial como uma alternativa terapêutica promissora no  
1765 combate ao parasita.

1766 O ensaio de viabilidade dos trofozoítos revelou que os compostos sal  
1767 sódico do ácido nalidíxico e enoxacina reduziram a viabilidade do parasito a  
1768 partir de 24 h. O MTS, um sal de tetrazólio análogo ao MTT, na presença de  
1769 metossulfato de fenazina (PMS), sofre redução enzimática direta em células  
1770 viáveis, utilizando cofatores como NADH<sup>+</sup> e NADH, gerando um produto de  
1771 formazan cuja absorção máxima ocorre a 490 nm em solução salina  
1772 tamponada com fosfato (CORY *et al.*, 1991). Como essa redução não está

1773 exclusivamente vinculada à função mitocondrial, mas também às reações de  
1774 oxidorredução que ocorrem através da membrana plasmática, permitindo a  
1775 redução extracelular dos sais de tetrazólio, o método pode ser ampliado para  
1776 organismos microaerofílicos e anaeróbicos, como *G. intestinalis* (HENRIQUES  
1777 *et al.*, 2011). Ao compararmos os resultados da proliferação celular nas  
1778 concentrações de 1-5  $\mu\text{M}$  do sal sódico do ácido nalidíxico e enoxacina com os  
1779 de viabilidade celular, os dados sugerem que os fármacos afetam mais  
1780 intensamente a multiplicação do parasito do que sua viabilidade, sendo a  
1781 funcionalidade das células alterada nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ . De  
1782 fato, observamos alteração no ciclo celular de parasitos expostos ao sal sódico  
1783 do ácido nalidíxico; com o acúmulo de células na fase G2/M. É bem  
1784 estabelecido que inibidores da topoisomerase II induzem a paralisação do ciclo  
1785 celular na fase G2/M (SOLIMAN *et al.*, 2023). No entanto, estudos anteriores  
1786 indicaram que esses compostos geralmente induzem uma acentuada  
1787 paralisação do ciclo celular na fase G2, consequência do extenso dano ao  
1788 DNA que ocasionam, ativando um rigoroso ponto de controle celular (D'ARCY  
1789 & GABRIELLI, 2017). No presente estudo, não observamos um aumento no  
1790 número de células em divisão, o que nos leva a sugerir que o efeito sobre o  
1791 ciclo celular esteja predominantemente associado à fase G2.

1792 A etapa seguinte consistiu em avaliar se o efeito dos inibidores nos  
1793 trofozoítos de *G. intestinalis* seria reversível após a retirada dos compostos. Os  
1794 resultados indicaram que as células previamente expostas ao sal sódico do  
1795 ácido nalidíxico, 24 h após a remoção do fármaco, ainda apresentaram uma  
1796 redução na proliferação, quando comparadas às células controle. Estes dados  
1797 indicam que os parasitos previamente tratados não restabeleceram a  
1798 replicação de forma eficiente no período analisado.

1799 Na fase subsequente, tornou-se fundamental avaliar a citotoxicidade  
1800 dos compostos sal sódico do ácido nalidíxico e enoxacina, que demonstraram  
1801 maior eficácia, em linhagens celulares humanas. Optou-se por realizar esses  
1802 ensaios utilizando células da linhagem epitelial intestinal humana *Caco-2*, uma  
1803 vez que essas células preservam características morfológicas e fenotípicas  
1804 das células epiteliais intestinais, tais como morfologia polarizada, presença de

1805 microvilosidades na superfície apical, expressão de enzimas de borda em  
1806 escova e a formação de junções ocludentes típicas (*tight junctions*) (SAMBUY  
1807 *et al.*, 2005; URDICIAIN *et al.*, 2019). Ademais, considerando que os  
1808 trofozoítos de *G. intestinalis* estabelecem o parasitismo em células epiteliais  
1809 intestinais, essa linhagem representa um modelo adequado para investigações  
1810 quimioterapêuticas relacionadas a esse protozoário.

1811 Nesse contexto, os resultados obtidos por meio do ensaio MTS/PMS  
1812 indicaram que o tratamento das células *Caco-2* com o sal sódico do ácido  
1813 nalidíxico, nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  por 72 h, não resultou em redução  
1814 da viabilidade celular, mantendo-se inalterada a atividade mitocondrial.  
1815 Observou-se apenas 20% de células inviáveis quando expostas às  
1816 concentrações mais elevadas do fármaco (50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Com base nesses  
1817 achados, foi calculado o índice de seletividade, cujo valor aproximado de 62,97  
1818 sugere uma maior seletividade desse composto para *G. intestinalis* do que para  
1819 as células *Caco-2*. Esses achados indicam que o composto permanece mais  
1820 eficaz contra *G. intestinalis*, reforçando seu potencial como agente  
1821 antiparasitário seletivo. Embora os inibidores da topoisomerase II sejam  
1822 amplamente empregados como agentes antineoplásicas, o sal sódico do ácido  
1823 nalidíxico testado neste estudo apresentou um valor de EC<sub>50</sub> de 270,8  $\mu\text{M}$ ,  
1824 superior ao do etoposídeo (58,96  $\mu\text{M}$ ), fármaco amplamente utilizado em  
1825 tratamentos contra o câncer. Por outro lado, uma série de análogos de  
1826 fluoroquinolonas tem demonstrado potencial promissor nesse contexto (ADLY *et*  
1827 *al.*, 2025).

1828 A análise realizada por microscopia eletrônica de varredura revelou que o  
1829 efeito primário do composto sal sódico do ácido nalidíxico foi o arredondamento  
1830 celular e o estreitamento da porção caudal do parasito, conjuntamente com a  
1831 internalização dos flagelos. Embora tais características sejam típicas de células  
1832 em estágios iniciais do processo de encistamento, essas mesmas modificações  
1833 também são observadas quando os parasitos são expostos a diferentes classes  
1834 de compostos (MIDDLEJ & BENCHIMOL, 2009, GADELHA *et al.*, 2019,  
1835 OLIVEIRA *et al.*, 2022). A literatura indica que, sob condições estressantes,  
1836 como escassez de nutrientes ou a presença de substâncias químicas,  
1837 protozoários formadores de cistos tendem a ser induzidos ao encistamento

1838 (VONLAUFEN *et al.*, 2008). Dessa forma, é plausível que , na presença do  
1839 composto sal sódico do ácido nalidíxico, os trofozoítos estejam submetidos a  
1840 condições de estresse, o que poderia desencadear o início do processo de  
1841 encistamento, onde os trofozoítos perdem sua capacidade de fixação, pois o  
1842 disco se fragmenta e os seus flagelos se internalizam (LAUWAET *et al.*, 2007)  
1843 embora essa diferenciação não se completaria uma vez que não foi possível  
1844 observar vesículas específicas de encistamento (*Encystation-specific vesicles* -  
1845 ESVs), nem a formação da parede cística ou a presença de cistos maduros em  
1846 nenhum dos ensaios realizados. Adicionalmente, os trofozoítos tratados  
1847 incubados com anticorpo anti-Cwp1, uma proteína específica da parede cística,  
1848 não exibiram marcação dessa proteína. Também foi observado que o  
1849 citoesqueleto do disco ventral permaneceu íntegro, contrastando com células  
1850 em encistamento ou cistos, que apresentam o disco fragmentado (BENCHIMOL,  
1851 2004b, KIM *et al.*, 2019). É importante ressaltar que as topoisomerases do tipo II  
1852 apresentam aumento em sua expressão durante o processo de encistamento,  
1853 de modo que, ao serem inibidas, tal processo não seria completamente  
1854 concluído (LIN *et al.*, 2013).

1855 Na literatura, diversos autores já relataram a internalização dos flagelos  
1856 ao tratar trofozoítos de *G. intestinalis* com diferentes substâncias. Busatti e  
1857 colaboradores (2013) observaram esse efeito ao tratar os trofozoítos com  
1858 metronidazol por 48 horas, enquanto Corrêa e Benchimol (2006) também  
1859 registraram a mesma alteração ao tratar as células com citocalasina D. Vale  
1860 ressaltar que a internalização dos flagelos pode sugerir que o composto sal  
1861 sódico do ácido nalidíxico interfere na regulação da tubulina. De fato, as  
1862 análises por imunofluorescência revelaram que os flagelos se apresentaram  
1863 mais curtos e espiralados. Da mesma forma, ao observarmos células com a  
1864 membrana extraída, notamos que os axonemas dos flagelos estavam mais  
1865 próximos ao corpo celular e menos projetados. Além disso, os microtúbulos que  
1866 formam os funis mostraram-se rompidos, com um espaçamento maior entre  
1867 cada um deles, em comparação às células controle. No entanto, são  
1868 necessários mais experimentos para confirmar se, de fato, houve a alteração da  
1869 tubulina nos trofozoítos tratados. Wang e colaboradores (2016) demonstraram  
1870 que os inibidores da topoisomerase I também exercem influência sobre os

1871 elementos do citoesqueleto, incluindo microtúbulos e filamentos de actina, os  
1872 autores sugeriam que tubulina e actina seriam um alvo molecular para estes  
1873 inibidores.

1874 A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou células  
1875 contendo vacúolos que apresentavam material citoplasmático em seu interior,  
1876 como glicogênio, além de lamelas concêntricas membranosas (figuras  
1877 mielínicas), características típicas de processos autofágicos. A autofagia é uma  
1878 via de degradação celular essencial para a manutenção da sobrevivência em  
1879 situações de estresse, como privação de nutrientes, estresse oxidativo e  
1880 envelhecimento (SUZUKI & OHSUMI, 2010). Estudos indicam a presença da via  
1881 autofágica em *G. intestinalis* e outros protozoários parasitos, como *Plasmodium*,  
1882 *Trypanosoma* e *Trichomonas*, porém, poucos genes chave envolvidos na  
1883 autofagia foram identificados no banco de dados do genoma de *G. intestinalis*. A  
1884 ausência de muitos genes relacionados à autofagia, como p62 e ATG5, sugere  
1885 que a via autofágica em *G. intestinalis* pode ser incompleta ou peculiar (WU *et*  
1886 *al.*, 2021). Pesquisas demonstraram que diferentes tipos celulares apresentam  
1887 vacúolos autofágicos nas fases iniciais do processo de autofagia, os quais  
1888 aumentam em número e volume nas etapas mais avançadas (GHARTEY-  
1889 KWANSAH *et al.*, 2022). As características ultraestruturais indicativas de um  
1890 processo autofágico observadas no parasito após o tratamento com o sal sódico  
1891 do ácido nalidíxico são comuns em *G. intestinalis* após a incubação com outras  
1892 classes de fármacos. Por exemplo, vacúolos autofágicos com membranas  
1893 concêntricas foram identificados após o tratamento com análogos do  
1894 metronidazol em *G. intestinalis* (BUSATTI *et al.*, 2013) e com novos inibidores  
1895 de histonas desacetilases (HDAC- Histone Deacetylases), denominados KH-  
1896 TFMDI, pertencente à família das 3-arilidenoindolin-2-onas, e KV-46, uma 4-  
1897 [(10H-fenotiazin-10-il)metil]-N-hidroxibenzamida (GADELHA *et al.*, 2019,  
1898 OLIVEIRA *et al.*, 2022). Como demonstrado, vacúolos com características  
1899 autofágicas estavam presentes logo após a administração de todas as  
1900 concentrações dos compostos estudados. É possível que a via autofágica seja  
1901 ativada inicialmente como uma resposta de defesa da célula.

1902 O ensaio de fragmentação de DNA revelou que as células tratadas com  
1903 o sal sódico do ácido nalidíxico nas concentrações de 10  $\mu$ M (8%) e 20  $\mu$ M

1904 (~42%), após 48 h de tratamento, apresentaram fragmentação no DNA, o que  
1905 poderia indicar morte celular por apoptose, uma característica típica de  
1906 inibidores da topoisomerase II (NEGRI *et al.*, 1995). No entanto, não foram  
1907 detectados corpos apoptóticos nem alterações típicas de apoptose no núcleo  
1908 das células tratadas com 10  $\mu$ M, quando analisadas por microscopia eletrônica  
1909 de transmissão. Diante da ausência dessas características morfológicas e da  
1910 presença de células com membranas rompidas, sugerimos que a  
1911 fragmentação do DNA possa estar relacionada a um processo de necrose  
1912 tardia. Ainda assim, são necessários experimentos adicionais para confirmar  
1913 essa hipótese e determinar com maior precisão o tipo de morte celular  
1914 envolvido. Com base nos resultados obtidos, acreditamos que o composto sal  
1915 sódico do ácido nalidíxico pode ser considerado uma alternativa potencial para  
1916 o desenvolvimento de um fármaco no tratamento da giardíase, uma vez que é  
1917 capaz de modificar processos biológicos, como a proliferação do parasito,  
1918 induzir alterações ultraestruturais, afetando principalmente os flagelos e os  
1919 funis, componentes essenciais para a motilidade parasitária e os flagelos  
1920 facilitares da divisão celular, além de gerar uma condição de estresse que  
1921 levaria à ativação de um mecanismo semelhante à autofagia. No entanto, são  
1922 necessários estudos adicionais para confirmar se este composto inibe as  
1923 topoisomerases do parasito ou se exerce efeito sobre outras vias metabólicas.  
1924 Os inibidores da topoisomerase poderiam representar uma opção de  
1925 tratamento alternativa ou complementar, podendo ser utilizados em  
1926 associação com metronidazol ou albendazol.

1927

1928

1929

1930

1931 **7. CONCLUSÕES**

1932

1933 • O composto sal sódico do ácido nalidíxico, um inibidor da topoisomerase II,  
1934 foi eficaz na inibição da proliferação e viabilidade de *G. intestinalis*

1935 • O efeito do composto sal sódico do ácido nalidíxico na proliferação do  
1936 parasito foi reversível, embora os parasitos tratados previamente não  
1937 restabeleçam a replicação de forma eficiente

1938 • O ciclo celular do parasita foi alterado após o tratamento com xxx,  
1939 especificamente na fase G2/M.

1940 • O composto sal sódico do ácido nalidíxico não foi citotóxico para as células  
1941 *Caco-2* nas concentrações usadas.

1942 • O sal sódico do ácido nalidíxico promoveu alterações nos componentes do  
1943 citoesqueleto do parasito induzindo a internalização dos flagelos.

1944 • Os inibidores de topoisomerase são candidatos a opções viáveis capazes  
1945 de atuar no desenvolvimento de fármacos alternativos para o tratamento da  
1946 giardíase.

1947

1948

1949 **8. REFERÊNCIAS**

1950 1. ABRAHAM, R. J., ABRAHAM, S., STEVENS, A. J., PAGE, S. W., *et al.*  
1951 Aminoguanidines: New leads for treatment of *Giardia duodenalis*  
1952 infection. **International Journal for Parasitology: Drugs and drug Resistance**. 10,  
1953 38–44, 2019. DOI:10.1016/j.ijpddr.2019.04.003.

1954 2. ABODEELY M, DUBOIS KN, HEHL A, *et al.* A contiguous compartment  
1955 functions as endoplasmic reticulum and endosome/lysosome in *Giardia*  
1956 *lamblia*. **American Society of Microbiology: Eukaryot Cell**. 8-11:1665-1676, 2009.  
1957 DOI:10.1128/EC.00123-09.

1958 3. ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, 14,  
1959 447-475, 2001. DOI: 10.1128/cmr.14.3.447-475.2001.

- 1960 4. ADLY ME, TAHER AT, AHMED FM, MAHMOUD AM, SALEM MA, EL-MASRY  
1961 RM. New series of fluoroquinolone derivatives as potential anticancer Agents:  
1962 Design, Synthesis, in vitro biological Evaluation, and Topoisomerase II  
1963 Inhibition. **Bioorganic Chemistry**. 156:108163, 2025.  
1964 DOI:10.1016/j.bioorg.2025.108163.
- 1965 5. ALBERTS, B., JOHSON, A., LEWIS, J., *et al.* **Molecular Biology of the Cell**,  
1966 5a EDITION, 278-279. 2010. ISBN: 9788536320663.
- 1967 6. ALLAIN, T., FEKETE, E., BURET, A.G. *Giardia* cysteine proteases: the teeth  
1968 behind the smile. **Trends in Parasitology**, 35, 636-648, 2019. DOI:  
1969 10.1016/j.pt.2019.06.003.
- 1970 7. ALLAIN T, BURET AG. Pathogenesis and post-infectious complications in  
1971 giardiasis. **Advances in Parasitology**. 107:173-199, 2020.  
1972 DOI:10.1016/bs.apar.2019.12.001.
- 1973 8. AW, J.Y.H., CLARKE, N.E., MCCARTHY, J.S. *et al.* *Giardia duodenalis*  
1974 infection in the context of a community-based deworming and water, sanitation and  
1975 hygiene trial in Timor-Leste. **Parasites Vectors**. 12, 491, 2019. DOI:  
1976 10.1186/s13071-019-3752-9.
- 1977 9. BELO, V.S., OLIVEIRA, R.B., FERNANDES, P.C., *et al.* Fatores associados à  
1978 ocorrência de parasitoses intestinais em uma população de crianças e adolescentes.  
1979 **Revista Paulista de Pediatria** [online]., v. 30, n.195-201, 2012. DOI:  
1980 10.1590/S0103-05822012000200007.
- 1981 10. BENCHIMOL, M; PIVA; CAMPANATI; DE SOUZA. Visualization of the funis of  
1982 *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy -  
1983 New insights. **Journal of Structural Biology**. 147, p. 102-115, 2004b. DOI:  
1984 10.1016/j.jsb.2004.01.017.
- 1985 11. BENCHIMOL, M. The nuclei of *Giardia lamblia*: new ultrastructural  
1986 observations. **Archives of Microbiology**. 183, 160–168, 2005. DOI:  
1987 10.1007/s00203-004-0751-8
- 1988 12. BENCHIMOL, M., GADELHA, A.P., DE SOUZA, W. Unusual cell structures  
1989 and organelles in *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* are potential drug  
1990 targets. **Microorganisms**, 10, 2176. 2022.  
1991 <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112176>.
- 1992 13. BENCHIMOL M, GADELHA AP, DE SOUZA W. Ultrastructural Alterations of  
1993 the Human Pathogen *Giardia intestinalis* after Drug Treatment. **Pathogens**. 12-  
1994 6:810, 2023. DOI:10.3390/pathogens12060810.
- 1995 14. BERNANDER, R., PALM, J.E.D., SVÄRD, S.G. Genome ploidy in different  
1996 stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cellular Microbiology**. 3: 55-62. 2001. DOI:  
1997 10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x
- 1998 15. BEZAGIO, R.C., COLLI, C.M., ROMERA, L.I.L. *et al.* Comparative analysis of  
1999 routine parasitological methods for recovery of cysts, molecular detection, and  
2000 genotyping of *Giardia duodenalis*. **European Journal of Clinical Microbiology &**  
2001 **Infectious Diseases**. 40, 2633–2638, 2021. DOI:10.1007/s10096-021-04280-9.
- 2002 16. BUSATTI, H.G.N.O., ALVES, R.J., SANTANA-ANJOS, K.G., GIL, F.F., CURY,  
2003 M.C., VANNIER-SANTOS, M.A., GOMES, M.A. Effects of metronidazole analogues  
2004 on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization. **Diagnostic**  
2005 **Microbiology and Infectious Disease**. 75, 160–164, 2013. DOI:  
2006 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.001.
- 2007 17. BURET, A. G. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*.  
2008 **Parasite**. 15, 261-265, 2008. DOI: 10.1051/parasite/2008153261

- 2009 18. BUSH NG, EVANS-ROBERTS K, MAXWELL A. DNA  
2010 Topoisomerases. **EcoSal Plus**. 6-2:10, 2015. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0010-  
2011 2014.
- 2012 19. BUZUN, K., BIELAWSKA, A., BIRLAWSKI, K., *et al.* DNA topoisomerases as  
2013 molecular targets for anticancer drugs. **Journal of Enzyme Inhibition and**  
2014 **Medicinal Chemistry**. 35:1, 1781-1799, 2020. DOI:  
2015 10.1080/14756366.2020.1821676.
- 2016 20. CAMPANATI L. BRÉ., M.H. LEVILLIERS, N., DE SOUZA, W. Expression of  
2017 tubulin polyglycylation in *Giardia lamblia*. **Biology of The Cell**. 91, 499-506. 1999.  
2018 DOI: 10.1016/S0248-4900(00)88206-4.
- 2019 21. CARVALHO K.P., MONTEIRO-LEAL L.H. The caudal complex of *Giardia*  
2020 *lamblia* and its relation to motility. **Experimental Parasitology**. 108, 154-162. 2004.  
2021 DOI: 10.1016/j.exppara.2004.08.007.
- 2022 22. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National**  
2023 **center for emerging and zoonotic infectious diseases (ncezid) division of**  
2024 **foodborne, waterborne, and environmental diseases (dfwed)**, 2024. Disponivel  
2025 em <[https://www.cdc.gov/giardia/about/?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/parasites/giardia/](https://www.cdc.gov/giardia/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/parasites/giardia/)>.  
2026
- 2027 23. CERNIKOVA L., FASO, C., HEHL AB. Five facts about *Giardia lamblia*. **PLoS**  
2028 **Pathogens** 14(9): e1007250. 2018. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007250.
- 2029 24. CHAABAN S., BROUHARD GJ. A microtubule bestiary: structural diversity in  
2030 tubulin polymers. **Molecular Biology of the Cell**. 28(22):2924-2931. 2017. DOI:  
2031 10.1091/mbc.E16-05-0271.
- 2032 25. CHEN, S. H., CHAN, N. L., & HSIEH, T. S. New mechanistic and functional  
2033 insights into DNA topoisomerases. **Annual review of biochemistry**. 82, 139–170,  
2034 2013. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061809-100002.
- 2035 26. COELHO, C.H., DURIGAN, M., LEAL, D.A.G., *et al.* Giardiasis as a neglected  
2036 disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLOS Neglected**  
2037 **Tropical Diseases**. 11, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006005.
- 2038 27. CORRÊA, G., BENCHIMOL, M. *Giardia lamblia* behavior under cytochalasins  
2039 treatment. **Parasitology Research**. 98, 250–256, 2006. DOI: 10.1007/s00436-005-  
2040 0065-z.
- 2041 28. CORY, A. H., OWEN, T. C., BARLTROP, J. A., *et al.* Use of an aqueous  
2042 soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer**  
2043 **communications**. 3(7), 207-212. 1991. DOI: 10.3727/095535491820873191.
- 2044 29. D ARCY, NICHOLAS, AND BRIAN GABRIELLI. Topoisomerase II Inhibitors  
2045 and Poisons, and the Influence of Cell Cycle Checkpoints. **Current Medicinal**  
2046 **Chemistry**. 24,25 1504-1519, 2017. DOI:10.2174/0929867323666161205122613
- 2047 30. DAVIDS BJ, LIU CM, HANSON EM, *et al.* Identification of Conserved  
2048 Candidate Vaccine Antigens in the Surface Proteome of *Giardia lamblia*. **Infection**  
2049 **and Immunity**. 87-6, e00219-19, 2019. DOI: 10.1128/IAI.00219-19.
- 2050 31. DAWSON S.C., HOUSE S.A. Imaging and analysis of the microtubule  
2051 cytoskeleton in *Giardia*. **Methods in Cell Biology**. 97:307-39. 2010. DOI:  
2052 10.1016/S0091-679X(10)97017-9.
- 2053 32. DE SOUZA, W., LANFREDI-RANGEL, A., CAMPANATI, L. Contribution of  
2054 Microscopy to Better Knowledge of the Biology of *Giardia lamblia*. **Microscopy and**  
2055 **Microanalysis**, 10(5), 513-527. 2004. DOI:10.1017/S1431927604040954.
- 2056 33. DIAS, SPR. Inibidores das DNA Topoisomerases como novos alvos  
2057 terapêuticos para o Trypanosoma brucei (Doença do Sono). **Faculdade de**  
2058 **Farmácia da Universidade de Coimbra**. Dissertação de mestrado, 2014.  
2059 <<https://hdl.handle.net/10316/81357>>.

- 2060 **34.** DI GENOVA, B.M., TONELLI, R.R. Infection strategies of intestinal parasite  
2061 pathogens and host cell responses. **Frontiers in Microbiology**, 7, 16. 2016. DOI:  
2062 10.3389 / fmicb.2016.0025.
- 2063 **35.** DIXON B.R. *Giardia duodenalis* in humans and animals - Transmission and  
2064 disease. **Research in Veterinary Science**. 135:283-289. 2021.  
2065 DOI:10.1016/j.rvsc.2020.09.034.
- 2066 **36.** EINARSSON E, MA'AYEH S, SVÄRD SG. An up-date on *Giardia* and  
2067 giardiasis. **Current Opinion in Microbiology**. 34: 47-52, 2016.  
2068 DOI:10.1016/j.mib.2016.07.019
- 2069 **37.** ELMENDORF, H.G., DAWSON, MCCAFFER. J.M.J. The cytoskeleton of  
2070 *Giardia lamblia*. **International Journal for Parasitology**. 33, 3-28. 2003. DOI:  
2071 10.1016/S0020-7519(02)00228-X.
- 2072 **38.** EMERY, S.J., BAKER, L., ANSELL, B.R.E., *et al.* Differential protein  
2073 expression and post-translational modifications in metronidazole-resistant *Giardia*  
2074 *duodenalis*. **GigaScience**, 7 (4): giy024., 2018. DOI: 10.1093/gigascience/giy024.
- 2075 **39.** EMERY-CORBIN, S., GRÜTTNER, J., SVARD, S. Transcriptomic and  
2076 proteomic analyses of *Giardia intestinalis*: intestinal epithelial cell interactions.  
2077 **Advances in Parasitology**. 107, 139-171, 2019. DOI: 10.1016/bs.apar.2019.11.002.
- 2078 **40.** ERLANDSEN, S. L.; BEMRICK, W. J.; PAWLEY, J. High-resolution electron  
2079 microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris*  
2080 and *Giardia duodenalis*. **The Journal of Parasitology**. 75, n. 5, p. 787-797, 1989.  
2081 DOI: 10.2307/3283065.
- 2082 **41.** FANTINATTI, M., GONÇALVES-PINTO, M., LOPES-OLIVEIRA, L., & DA-  
2083 CRUZ, A. Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a  
2084 long way to go. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, 2021. DOI:  
2085 10.1590/0074-02760200431.
- 2086 **42.** FENG, J.M., YANG, C.L., TIAN, H.F., *et al.* Identification and evolutionary  
2087 analysis of the nucleolar proteome of *Giardia lamblia*. **Biomedicine Central**  
2088 **Genomics**. 21, 269. 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-6679-9.
- 2089 **43.** FERREIRA LG, ANDRICOPULO AD. Drug repositioning approaches to  
2090 parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective. **Drug Discov Today**. 21-  
2091 10:1699-1710, 2016. DOI:10.1016/j.drudis.2016.06.021.
- 2092 **44.** FUSARO C, CHÁVEZ-ROMERO YA, PRADA SLG, *et al.* Burden and  
2093 Epidemiology of Human Intestinal *Giardia duodenalis* Infection in Colombia: A  
2094 Systematic Review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**. 7-10:325, 2022.  
2095 DOI: 10.3390/tropicalmed7100325.
- 2096 **45.** GADELHA, A.P.R., BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W. The structural  
2097 organization of *Giardia intestinalis* cytoskeleton. **Advances in Parasitology**, 107, 1-  
2098 23, 2019. DOI: 10.1016/bs.apar.2019.08.003.
- 2099 **46.** GADELHA, A.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Nanoarchitecture of the  
2100 ventral disc of *Giardia intestinalis* as revealed by high-resolution scanning electron  
2101 microscopy and helium ion microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**. 2022.  
2102 <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02060-2>.
- 2103 **47.** GAONA-LÓPEZ C, MARTÍNEZ-VÁZQUEZ AV, VILLALOBOS-ROCHA JC,  
2104 JUÁREZ-RENDÓN KJ, RIVERA G. Analysis of *Giardia lamblia* Nucleolus as Drug  
2105 Target: A Review. **Pharmaceuticals (Basel)**. 16(8):1168, 2023.  
2106 DOI:10.3390/ph16081168.
- 2107 **48.** GHARTEY-KWANSAH, G., ADU-NTI, F., ABOAGYE, B., ANKOBIL, A.,  
2108 ESSUMAN, E. E., OPOKU, Y. K., BOAMPONG, J. N. Autophagy in the control and  
2109 pathogenesis of parasitic infections. **Cell & Bioscience**. 10, 101- 110, 2020. DOI:  
2110 10.1186/s13578-020-00464-6.
- 2111 **49.** GILLIN, F.D., REINER, D.S. MCCAFFERY J. M. Cell biology of the primitive  
2112 eukaryote *Giardia lamblia*. **Annual Review of Microbiology**. 50:679-705. 1996.  
2113 Downloaded from w w w.annualreviews.org.

- 2114 50. GRÜTTNER J, VAN RIJN JM, GEISER P, *et al.* Trophozoite fitness dictates  
2115 the intestinal epithelial cell response to *Giardia intestinalis* infection. **PLoS**  
2116 **Pathogens**. 19-5, 2023 DOI:10.1371/journal.ppat.1011372.
- 2117 51. GUTIÉRREZ, A.M.Q. Giardiasis Epidemiology. **Current Topics in Giardiasis**.  
2118 2, 14-24, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.70338.
- 2119 52. HAGEN K.D., HIRAKAWA M.P., HOUSE S.A., *et al.* Novel Structural  
2120 Components of the Ventral Disc and Lateral Crest in *Giardia intestinalis*. **PLOS**  
2121 **Neglected Tropical Diseases**. 5(12): e1442. 2011. DOI:  
2122 10.1371/journal.pntd.0001442.
- 2123 53. HAGEN, K.D., MCINALLY, S.G., HILTON, N.D., DAWSON, S.C., Microtubule  
2124 organelles in *Giardia*. **Advances in Parasitology**. 107, 25-96, 2020. DOI:  
2125 10.1016/bs.apar.2019.11.001.
- 2126 54. HALLIEZ MC, BURET AG. Extra-intestinal and long term consequences of  
2127 *Giardia duodenalis* infections. **World Journal of Gastroenterology**. 9, 47:8974-85,  
2128 2013. DOI: 10.3748/wjg.v19.i47.8974.
- 2129 55. HE D, WEN JF, CHEN WQ, LU SQ, XIN DD. Identification, characteristic and  
2130 phylogenetic analysis of type II DNA topoisomerase gene in *Giardia lamblia*. **Cell**  
2131 **Research**. 15-6:474-482, 2005. DOI:10.1038/sj.cr.7290316.
- 2132 56. HENRIQUES, C., MOREIRA, T.L.B., MAIA-BRIGAGÃO, C., *et al.* Tetrazolium  
2133 salt-based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy.  
2134 **Analytical Methods**, 3, 2148-2155, 2011. DOI: 10.1039/c1ay05219e.
- 2135 57. HOLBERTON, D.V. Fine structure of the ventral disc apparatus and the  
2136 mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. **Journal of Cell Science**.  
2137 13, 11-41, 1973. Disponível em <  
2138 <https://jcs.biologists.org/content/joces/13/1/11.full.pdf>>.
- 2139 58. HOOSHYAR, H., ROSTAMKHANI, P., ARBABI, M., *et al.* *Giardia lamblia*  
2140 infection: a review of current diagnostic strategies. **Gastroenterology and**  
2141 **Hepatology From Bed to Bench**. 12, 3-12, 2019. PMID: 30949313.
- 2142 59. HOUSE S.A., RICHTER D.J., PHAM J.K., *et al.* *Giardia Flagellar* Motility Is Not  
2143 Directly Required to Maintain Attachment to Surfaces. **PLoS Pathogens**. 7(8):  
2144 e1002167. 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002167.
- 2145 60. JEDELSKÝ, P.L., DOLEŽAL, P. RADA, P., *et al.* The minimal proteome in the  
2146 reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. **PloS One**. 6, 2:  
2147 e17285, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017285.
- 2148 61. JIMENEZ-GARCIA, L., ZAVALA, G., CHÁVEZ-MUNGUÍA, B., *et al.*  
2149 Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*.  
2150 **International Journal for Parasitology**. 38, 1297–1304, 2008. DOI:  
2151 10.1016/j.ijpara.2008.04.012.
- 2152 62. JIRÁKOVÁ, K., KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E. How nuclei of *Giardia* pass  
2153 through cell differentiation: semi-open mitosis followed by nuclear interconnection.  
2154 **Protist**. 163, 465–479, 2012. DOI: 10.1016/j.protis.2011.11.008.
- 2155 63. KIM, DW., PARK JM., YOON, BW., *et al.* Metronidazole-induced  
2156 encephalopathy. **Journal of the Neurological Sciences**. 224, 1–2.107-111. 2004.  
2157 DOI: 10.1016/j.jns.2004.06.012.
- 2158 64. KIM, J.E., PARK, S.J. Role of gamma-giardin in ventral disc formation of  
2159 *Giardia lamblia*. **Parasites & Vectors**, 12, 227, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-  
2160 3478-8.
- 2161 65. KOHL, L., SHERWIN, T., & GULL, K. Assembly of the paraflagellar rod and the  
2162 flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. The  
2163 **Journal of Eukaryotic Microbiology**. 46-2, 105–, 1999. DOI:  
2164 10.1111/j.15507408.1999.tb04592.x
- 2165 66. LALLE, MARCO, AND KURT HANEVIK. Treatment-refractory giardiasis:  
2166 challenges and solutions. **Infection and Drug Resistance**, 11, 1921-1933, 2018.  
2167 DOI:10.2147/IDR.S141468.

- 2168 67. LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., et al. The  
 2169 peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may  
 2170 correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **Journal of Structural**  
 2171 **Biology**. 123, 225–235, 1998. DOI: 10.1006/jsbi.1998.4035.
- 2172 68. LARA-MARTÍNEZ, R., DE LOURDES SEGURA-VALDEZ, M., DE LA MORA-  
 2173 DE LA MORA, I., LÓPEZ-VELÁZQUEZ, G. AND JIMÉNEZ-GARCÍA, L.F.  
 2174 Morphological Studies of Nucleologenesis in *Giardia lamblia*. **The Anatomical**  
 2175 **Record**. 299: 549-556, 2016. DOI: 10.1002/ar.23323.
- 2176 69. LAUWAET, T., DAVIDS, B. J., REINER, D. S., & GILLIN, F. D. Encystation of  
 2177 *Giardia lamblia*: a model for other parasites. **Current opinion in**  
 2178 **microbiology**. 10(6), 554–559, 2007. DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.011.
- 2179 70. LE BLANCQ S.M., ADAM R.D. Structural basis of karyotype heterogeneity in  
 2180 *Giardia lamblia*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 30;97,1-2:199-208.  
 2181 1998. DOI: 10.1016/s0166-6851(98)00150-9.
- 2182 71. LEUNG, A. K. C.; LEUNG, A. A. M.; WONG, A. H. C.; SERGI, C. M. et al.  
 2183 Giardiasis: An Overview. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug**  
 2184 **Discovery**, 13, n. 2, p. 134-143, 2019. DOI:  
 2185 10.2174/1872213x13666190618124901
- 2186 72. LEITSCH, D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*.  
 2187 **Current Tropical Medicine Reports**. 2-3:128-135. 2015. DOI: 10.1007/s40475-  
 2188 015-0051.
- 2189 73. LIN, B.C., LH S.U., SC, WENG., et al. Correction: DNA Topoisomerase II Is  
 2190 Involved in Regulation of Cyst Wall Protein Genes and Differentiation in *Giardia*  
 2191 *lamblia*. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 11(1): e0005326, 2017. DOI:  
 2192 10.1371/journal.pntd.0005326 View correction.
- 2193 74. LIN B.C., LH, S.U., SC, WENG., et al. DNA Topoisomerase II Is Involved in  
 2194 Regulation of Cyst Wall Protein Genes and Differentiation in *Giardia lamblia*. **PLOS**  
 2195 **Neglected Tropical Diseases** 7(5): e2218. 2013. DOI:  
 2196 https10.1371/journal.pntd.0002218.
- 2197 75. LIPOLDOVÁ M. *Giardia* and Vilém Dušan Lambl. **PLoS Neglected Tropical**  
 2198 **diseases**. 8-5, e2686, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002686.
- 2199 76. LÓPEZ-VELÁZQUEZ, G., FERNÁNDEZ-LAINEZ, C., DE LA MORA-DE LA  
 2200 MORA, J.I. et al. On the molecular and cellular effects of omeprazole to further  
 2201 support its effectiveness as an anti-giardial drug. **Scientific Reports**. 9, 8922, 2019.  
 2202 DOI: 10.1038/s41598-019-45529-w.
- 2203 77. LOURENÇO, D., ANDRADE, L.D.S., TERRA, L.L. et al. Proteomic analysis of  
 2204 the ventral disc of *Giardia lamblia*. **BMC Research Notes**. 5, 41, 2012. DOI:  
 2205 10.1186/1756-0500-5-41.
- 2206 78. LYU, Z., SHAO, J., XUE, M. et al. A new species of *Giardia* Künstler, 1882  
 2207 (Sarcocystidophora: Hexamitidae) in hamsters. **Parasites and Vectors** 11, 202,  
 2208 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2786-8.
- 2209 79. MAIA-BRIGAGÃO, C.; GADELHA, A. P.; DE SOUZA, W. New associated  
 2210 structures of the anterior flagella of *Giardia duodenalis*. **Microscopy and**  
 2211 **Microanalysis**, 19, n. 5, p. 1374-1376, 2013. DOI:10.1017/s1431927613013275.
- 2212 80. MAKIUCHI, T., NOZAKI, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles  
 2213 in anaerobic parasitic protozoa. **Biochimie**. 100:3-17. 2014. DOI:  
 2214 10.1016/j.biochi.2013.11.018.
- 2215 81. MCNALLY, S.G., DAWSON, S.C. Eight unique basal bodies in the multi-  
 2216 flagellated diplomonad *Giardia lamblia*. **Cilia**. 5:21. 2016. DOI: 10.1186/s13630-  
 2217 016-0042-4.
- 2218 82. MIDDLEJ, V., BENCHIMOL, M. *Giardia lamblia* behavior during encystment:  
 2219 How morphological changes in shape occur. **Parasitology International**. 58, 72–80,  
 2220 2009. DOI: 10.1016/j.parint.2008.11.002.

- 2221 83. MIDDLEJ; SOUZA, D.; BENCHIMOL. **Giardia Intestinalis : An Intriguing**  
2222 **Smile-Faced Parasite**, 2016. Disponível em: <https://shre.ink/bvfr>.
- 2223 84. MIDDLEJ, V., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. The endomembrane system of  
2224 *Giardia intestinalis*. **Current Topics in Giardiasis**, 6, 88-108, 2017. DOI:  
2225 10.5772/intechopen.70875.
- 2226 85. MIDDLEJ, V., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. The peripheral vesicles gather  
2227 multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle,  
2228 **Journal of Structural Biology**. 207, 301-311. 2019. DOI:  
2229 10.1016/j.jsb.2019.07.002.
- 2230 86. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023. Número de internações por Giardíase  
2231 segundo UF. Brasil, 2017 a 2023. Sistema de informações hospitalares do SUS.  
2232 Disponível em: <https://shre.ink/bvft> (Acesso em 14/09/2024).
- 2233 87. MITTRA, B., SAHA, A., CHOWDHURY, A. R., PAL, C., MANDAL, S. *et al.*  
2234 Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts  
2235 by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to  
2236 apoptosis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass)**. 6-6, 527–541, 2000.
- 2237 88. MOYANO, S., MUSSO, J., FELIZIANI, C., *et al.* Exosome biogenesis in the  
2238 protozoa parasite *Giardia lamblia*: a model of reduced interorganellar crosstalk.  
2239 **Cells**, 8, 2-20, 2019. DOI: 10.3390/cells8121600.
- 2240 89. MULLER, J., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Physiological aspects of nitro drug  
2241 resistance in *Giardia lamblia*. **International Journal for Parasitology: Drugs and**  
2242 **Drug Resistance**. 8, 271–277, 2018. DOI:  
2243 10.1016/j.ijpddr.2018.04.008.
- 2244 90. NITISS, J. L., KIIANITSA, K., SUN, Y., NITISS, K. C., & MAIZELS, N.  
2245 Topoisomerase Assays. **Current protocols**. 1(10), e250, 2021. DOI:  
2246 10.1002/cpz1.250.
- 2247 91. NOHYNKOVA, E. Localization of gamma-tubulin in interphase and mitotic cells  
2248 of a unicellular eukaryote. **European Journal of Cell Biology**. 79, 438–445, 2000.  
2249 DOI: 10.1078/0171-9335-00066.
- 2250 92. NOSALA, C., DAWSON, S.C. The critical role of the cytoskeleton in the  
2251 pathogenesis of *Giardia*. **Current Clinical Microbiology Reports**. 2, 155–162,  
2252 2015. DOI: 10.1007/s40588-015-0026-y.
- 2253 93. NOSALA, C., HAGEN, K.D., DAWSON, S.C. “Disc-o-Fever”: getting down with  
2254 *Giardia*’s groovy microtubule organelle. **Trends in Cell Biology**, 28, 99–112, 2018.  
2255 DOI: 10.1016/j.tcb.2017.10.007.
- 2256 94. OLIVEIRA RVF, DE SOUZA W, VÖGERL K, BRACHER F, BENCHIMOL M,  
2257 GADELHA APR. In vitro effects of the 4-[(10H-phenothiazin-10-yl)methyl]-N-  
2258 hydroxybenzamide on *Giardia intestinalis* trophozoites. **Acta Tropica**. 232,106484,  
2259 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106484.
- 2260 95. PATHURI, P., EMILY, T.N.G., GABRIEL, O., *et al.* Apo and Calcium-Bound  
2261 Crystal Structures of Cytoskeletal Protein Alpha-14 Giardin (Annexin E1) from the  
2262 Intestinal Protozoan Parasite *Giardia lamblia*, **Journal of Molecular Biology**. 385,  
2263 1098-1112. 2009. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.012.
- 2264 96. PIVA, B., BENCHIMOL, M. The median body of *Giardia lamblia*: an  
2265 ultrastructural study. **Biology of The Cell**. 96, 735-46, 2004. DOI:  
2266 10.1016/j.biolcel.2004.05.006.
- 2267 97. POMMIER, Y., SUN, Y., HUANG, S. N., & NITISS, J. L. Roles of eukaryotic  
2268 topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature reviews.**  
2269 **Molecular Cell Biology**. 17 -11, 703–721, 2016. DOI: 10.1038/nrm.2016.111.
- 2270 98. POXLEITNER, M. K., DAWSON, S. C., & CANDE, W. Z. Cell cycle synchrony  
2271 in *Giardia intestinalis* cultures achieved by using nocodazole and  
2272 aphidicolin. **Eukaryotic Cell**. 7, 569–574, 2008. DOI: 10.1128/EC.00415-07

- 2273 99. REGOES, A., ZOURMPANOU, D., LEÓN-AVILA, G., et al. Protein import,  
2274 replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. **Journal of Biological**  
2275 **Chemistry**. 280, 30557-63, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M500787200.
- 2276 100. ROGAWSKI, E.T., BARTELT, L.A., MILLS, P.J.A., et al. Determinants and  
2277 Impact of Giardia Infection in the First 2 Years of Life in the MAL-ED Birth Cohort.  
2278 **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**. 6, 153–160. 2017. DOI:  
2279 10.1093/jpids/piw082.
- 2280 101. ROGER A. J., SVÄRD S. G., TOVAR J., et al. A mitochondrial-like chaperonin  
2281 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an  
2282 endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. **Proceedings of the**  
2283 **National Academy of Sciences**. 95, 229, 1998. DOI:10.1073/pnas.95.1.229.
- 2284 102. ROUT, S., ZUMTHOR, J.P., SCHRANER, E.M., et al. An interactome-  
2285 centered protein discovery approach reveals novel components involved in  
2286 mitosome function and homeostasis in *Giardia lamblia*. **PLOS Pathogens**. 12,1-35,  
2287 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006036.
- 2288 103. SAMBUY, Y., DE ANGELIS, I., RANALDI, G., SCARINO, M.L., STAMMATI, A.,  
2289 ZUCCO F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell  
2290 and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology**  
2291 **Toxicology**. 21, 1-26, 2005. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- 2292 104. SAGHAUG, C.S., KLOTZ, C., KALLIO, J.P., et al. Genetic variation in  
2293 metronidazole metabolism and oxidative stress pathways in clinical *Giardia lamblia*  
2294 assemblage A and B isolates **Infection and Drug Resistance**, 12, 1221–1235,  
2295 2019. DOI: 10.2147/IDR.S177997.
- 2296 105. SATO, M., GALVANI, A., PADULA, J., NARDOCCI, A., LAURETTO, M.,  
2297 RAZZOLINI, M., & HACHICH, E. Assessing the infection risk of *Giardia* and  
2298 *Cryptosporidium* in public drinking water delivered by surface water systems in Sao  
2299 Paulo State, Brazil. **The Science of The Total Environment**. 442, 389-96,  
2300 2013 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.077>.
- 2301 106. SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia and Cryptosporidium* join the  
2302 neglected diseases initiative. **Trends in Parasitology**, 22, 203–208, 2006. DOI:  
2303 10.1016/j.pt.2006.02.015.
- 2304 107. SHARIFI-SARASIABI, K., HEYDARI-HENGAMI, M., SHOKRI, A., &  
2305 HOSSEYNITESHNIZI, S. Prevalence of intestinal parasitic infection in food handlers  
2306 of Iran: A systematic review and meta-analysis. **Veterinary Medicine and Science**.  
2307 7(6), 2450–2462, 2021. DOI: 10.1002/vms3.590.
- 2308 108. SHEFFIELD, H G, AND B BJORVAT. Ultrastructure of the cyst of *Giardia*  
2309 *lamblia*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 26,1, 23-30,  
2310 1977. DOI: 10.4269/ajtmh.1977.26.23.
- 2311 109. SIMSEK Z, KORUK I, COPUR AC, GÜRSES G. Prevalence of *Staphylococcus*  
2312 *aureus* and intestinal parasites among food handlers in Sanliurfa, Southeastern  
2313 Anatolia. **Journal of Public Health Management and Practice**. 15(6), 518–523,  
2314 2009. DOI: 10.1097/PHH.0b013e3181aa2814.
- 2315 110. SOLIMAN, T. N., KEIFENHEIM, D., PARKER, P. J., & CLARKE, D. J. (2023).  
2316 Cell cycle responses to Topoisomerase II inhibition: Molecular mechanisms and  
2317 clinical implications. **The Journal of Cell Biology**. 222-12, 2023. DOI:  
2318 10.1083/jcb.202209125.
- 2319 111. SOLTYS, B.J., GUPTA, R.S. Immunoelectron Microscopy of *Giardia lamblia*  
2320 Cytoskeleton Using Antibody to Acetylated  $\alpha$ -Tubulin. **Journal of Eukaryotic**  
2321 **Microbiology**. 41: 625-632. 1994. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1994.tb01524.x.
- 2322 112. SOLTYS, B.J., FALAH, M., GUPTA, R.S. Identification of endoplasmic  
2323 reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy  
2324 and antibody to Bip. **Journal of Cell Science**. 109 (7): 1909–1917. 1996. DOI:  
2325 <https://doi.org/10.1242/jcs.109.7.1909>.

- 2326 113. SOUSA, M.C., DA SILVA, J.P. The cytotoxic effects of ciprofloxacin in *Giardia*  
2327 *lamblia* trophozoites, **Toxicology in Vitro**. 15, 297-301, 2001. DOI: 10.1016/S0887-  
2328 2333(01)00026-1.
- 2329 114. SUÁREZ-RICO, D. O., MUNGUÍA-HUIZAR, F. J., CORTÉS-ZÁRATE, R *et al.*  
2330 Repurposing Terfenadine as a Novel Antigiardial Compound. **Pharmaceuticals**. 16-  
2331 9, 1332, 2023. DOI: 10.3390/ph16091332.
- 2332 115. SUN, C.H., WENG, S.C., WU J.H., *et al.* DNA topoisomerase III $\beta$  promotes  
2333 cyst generation by inducing cyst wall protein gene expression in *Giardia lamblia*.  
2334 **Open Biology**, 2020. DOI: 10.1098/rsob.190228.
- 2335 116. SUZUKI, K., OHSUMI, Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal  
2336 structure (PAS). **FEBS Letters**. 2;584(7):1280-6. 2010. DOI:  
2337 10.1016/j.febslet.2010.02.001.
- 2338 117. SVÄRD, S.G., PER, HAGBLOM, J.E., DANIEL, PALM. *Giardia lamblia* — a  
2339 model organism for eukaryotic cell differentiation. **FEMS Microbiology Letters**, 218,  
2340 1, 3–7, 2003. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11490.x.
- 2341 118. URDICIAIN, A ERAUSQUIN E., MELÉNDEZ, B., REY, J., IDOATE, M.,  
2342 CASTRESANA, J. Tubastatina A, an inhibitor of HDAC6, enhances temozolomide-  
2343 induced apoptosis and reverses the malignant phenotype of glioblastoma cells.  
2344 **International Journal of Oncology**. 54, 1797-1808, 2019. DOI:  
2345 10.3892/ijo.2019.4739.
- 2346 119. TAN, S., MUDEPPA, D.G., KOKKONDA, S., *et al.* Properties of Plasmodium  
2347 falciparum with a Deleted Apicoplast DNA Gyrase. **Antimicrobial Agents and**  
2348 **Chemotherapy**, 08-17 65(9): e00586-21 2021. DOI: 10.1128/AAC.00586-21.
- 2349 120. TIAN, X.F., YANG, Z.H., SHEN, H., *et al.* Identification of the nucleoli of *Giardia*  
2350 *lamblia* with TEM and CFM. **Parasitology Research**. 106, 789–793, 2010. DOI:  
2351 10.1007/s00436-009-1715-3.
- 2352 121. TOVAR, J., LEON-AVILA, G., SANCHEZ, L.B., *et al.* Mitochondrial remnant  
2353 organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation.  
2354 **Nature, London**, 6963, 172-176, 2003. DOI: 10.1038/nature01945.
- 2355 122. TŮMOVÁ; KULDA; NOHYNKOVÁ. Cell division of *Giardia intestinalis*:  
2356 Assembly and disassembly of the adhesive disc, and the cytokinesis. **Cell Motility**.  
2357 64, n. 4, p. 288-298, 2007. DOI:10.1002/cm.20183.
- 2358 123. VAHRMANN, A., SARIĆ, M., KOEBSCH I, SCHOLZE H. alpha14-Giardin  
2359 (annexin E1) is associated with tubulin in trophozoites of *Giardia lamblia* and forms  
2360 local slubs in the flagella. **Parasitology Research**. 102(2):321-6. 2008. DOI:  
2361 10.1007/s00436-007-0758-6.
- 2362 124. VANN, K. R., OVIATT, A., OSHEROFF, N. Topoisomerase II Poisons:  
2363 Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors. **Biochemistry**. 60 (21),  
2364 1630-1641. 2021. DOI: 10.1021/acs.biochem.1c00240.
- 2365 125. VERDAN, R.; PATRICIO, B.; WEISMULLER, G.; MIRANDA, K. *et al.*  
2366 Characterization of a new extra-axonemal structure in the *Giardia intestinalis* flagella.  
2367 **Journal of Structural Biology**. 216, 1, 108-064, 2024. DOI:  
2368 10.1016/j.jsb.2024.108064.
- 2369 126. WAMPFLER, P.B., TOSEVSKI, V., NANNI, P., *et al.* Proteomics of secretory  
2370 and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. **PLoS ONE**. 9, 1-19, 2014. DOI:  
2371 10.1371 / journal.pone.0094089.
- 2372 127. WANG, X., TANAKA, M., KRSTIN, S., PEIXOTO, H. S., MOURA, C. C. M., &  
2373 WINK, M. Cytoskeletal interference - A new mode of action for the anticancer drugs  
2374 camptothecin and topotecan. **European Journal of Pharmacology**. 789, 265–274,  
2375 2016. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.07.044.

- 2376 **128.** WANG J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular  
2377 perspective. Nature reviews. **Molecular Cell Biology**. 3-6, 430–440, 2002. DOI:  
2378 10.1038/nrm831.
- 2379 **129.** WU, J.H., TUNG, S.Y., HO, C.C., *et al.* A myeloid leukemia factor homolog  
2380 involved in encystation-induced protein metabolism in *Giardia lamblia*. **Biochimica**  
2381 **et Biophysica Acta (BBA)**. 1865, 6, 129859, 2021.  
2382 DOI:10.1016/j.bbagen.2021.129859.
- 2383 **130.** YODER, J. S., HARRAL, C., BEACH, M. J., & CENTERS FOR DISEASE  
2384 CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2010. **Giardiasis surveillance - United**  
2385 **States, 2006-2008**. Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries  
2386 (Washington, D.C. : 2002), 59(6), 15–25.
- 2387 **131.** ZAMPONI, N., ZAMPONI, E., MAYOL, G.F., *et al.* Endoplasmic reticulum is  
2388 the sorting core facility in the Golgi-lacking protozoan *Giardia lamblia*. **Traffic**. 18,  
2389 604–621, 2017. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026398.
- 2390 **132.** ZUMA, A.A., CAVALCANTI, D.P., MAIA, M.C.P., *et al.* Effect of topoisomerase  
2391 inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of  
2392 *Trypanosoma cruzi*, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 5, 449-  
2393 456. 2011. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.11.031.
- 2394 **133.** ZUMA, A.A., MENDES, I.C., REIGNAULT, L.C., *et al.* How *Trypanosoma cruzi*  
2395 handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor.  
2396 **Molecular and Biochemical Parasitology**. 193, 93-100. 2014. DOI: https  
2397 10.1016/j.molbiopara.2014.02.001.