



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO GAVINHO

ESTUDO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE VESÍCULAS EXTRACELULARES
PRODUZIDAS POR *GIARDIA INTESTINALIS*

CURITIBA

2020

BRUNO GAVINHO

ESTUDO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE VESICULAS EXTRACEULARES
PRODUZIDAS POR *GIARDIA INTESTINALIS*.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez

CURITIBA

2020

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

Gavinho, Bruno
Estudo das diferentes populações de vesículas extracelulares
produzidas por *Giardia intestinalis*. / Bruno Gavinho. – Curitiba, 2020.
104 p.: il.

Orientador: Marcel Ivan Ramirez.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. Giardia. 2. Relação hospedeiro-parasito. 3. Vesículas extracelulares.
4. Canabidiol. I. Título. II. Ramirez, Marcel Ivan. III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 616.34



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de BRUNO GAVINHO intitulada: ESTUDO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR *Giardia intestinalis*, sob orientação do Prof. Dr. MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica
14/12/2020 06:58:25.0
MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
11/12/2020 09:45:14.0
MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/12/2020 17:34:33.0
LETUSA ALBRECHT
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica
14/12/2020 14:23:31.0
RITA DE CASSIA RUIZ
Avaliador Externo (INSTITUTO BUTANTAN)

AGRADECIMENTOS

Hans Castorp, em *A montanha mágica*, de Thomas Mann concluiu que o tempo, à sua maneira silenciosa e, contudo, ativa, faz tantas transformações, mesmo a curto prazo, que nos desgarramos dele, e vice-e-versa. Foram apenas quatro anos de doutorado, mas há muitos a quem agradecer em tão pouco espaço. À minha família, em especial a minha esposa Ana Carolina, por toda a dedicação e amor, obrigado pela sua presença e apoio.

Durante o período em que estive envolvido com meus colegas de laboratório, sou muito grato pelo convívio, e todas as alegrias que passei. Me sinto muito privilegiado por ser instruído pelo professor Marcel Ivan Ramirez, quem moldou toda a minha postura científica, muito generoso e compreensivo ao longo da minha jornada. São poucos aqueles que conseguem trabalhar de forma apaixonada, mesmo com todas as limitações da ciência brasileira atual. Aos meus colegas do grupo de pesquisa EVAHPI: Izadora Volpato, Bruna Sabatke, Maria Alice Ferreira Nunes e Cássio Idelan, que me proporcionaram alegria, muita ajuda e aprendizado! Este trabalho não seria possível sem este grupo, e desejo que todos tenham muito sucesso!

Minha admiração e gratidão a José Sáenz, por todos os nossos cafés filosóficos, e pela amizade. Estou certo que alguns Joses a mais é tudo o que a ciência latino-americana precisa. Obrigado também aos pesquisadores que me auxiliaram na produção e execução de vários procedimentos: ao prof. Gláucio Valdameri e seu grupo (Departamento de Análises Clínicas - UFPR), a prof^a Giovana Nunes e seu grupo (Departamento de Química - UFPR), ao prof. Giuseppe Palmisano e seu grupo (Laboratório de Glicoproteômica – USP), a prof^a Larissa Alvarenga e a seu grupo (Laboratório de Imunoquímica- UFPR), a prof^a Sheila e seu grupo (Departamento de Bioquímica – UFPR) e a prof^a Magda da Costa Ribeiro e seu grupo (Departamento de Patologia Básica – UFPR). Estes pesquisadores e seus alunos representam o valor de uma universidade. Sou grato também ao prof. Wanderson Duarte da Rocha, por oferecer o espaço necessário ao meu trabalho, o laboratório GFP – UFPR. Desejo todo o sucesso a seu grupo, e aos colegas do laboratório que tive. Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, responsáveis pelo financiamento que tornou possível o trabalho.

“A inteligência é o farol que nos guia, mas é a vontade que nos faz caminhar”. (Érico Veríssimo)

RESUMO

Giardia intestinalis, um protozoário microaerofílico, é um importante agente etiológico de infecção intestinal em todo o mundo, conhecido também por ser a “diarréia do viajante”. Há evidências de que, em diversas condições, o parasita é capaz de liberar vesículas extracelulares (VEs) que modulam a fisiopatologia da giardíase. Neste trabalho, descrevemos novas características da produção de VEs de *G. intestinalis*, revelando sua capacidade de liberar duas populações diferentes de VEs enriquecidas: vesículas extracelulares largas (VELs) e pequenas (VEPs), assim como funções de adesão relevantes associadas à população maior. A análise proteômica revelou diferenças em proteínas importantes para a virulência e também para as interações patógeno-hospedeiro entre os dois tipos de VEs, como proteínas de resposta ao estresse antioxidante e citoesquelético em VELs. Avaliamos o efeito de dois inibidores associados à liberação de VEs em células de mamíferos, a saber, inibidores de peptidilarginina deiminases (PAD) e canabidiol (CBD), na liberação de VEs de *Giardia*. Os compostos foram ambos capazes de reduzir efetivamente a liberação de VEs, o inibidor de PAD afetando especificamente a liberação de VELs e reduzindo a adesão do parasita às células hospedeiras *in vitro*. Nossos resultados sugerem que VELs e VEPs têm um papel diferente na interação patógeno-hospedeiro, e que o tratamento com inibidores de VEs pode ser uma nova estratégia de tratamento para a giardíase. Além disso, investigaram-se os efeitos do decavanadato de sódio (doravante denominado NaV10), nicotinamida (composto I) e isonicotinamida (composto II) em células de *Giardia intestinalis*. A exposição dos trofozoítos de *Giardia* ao NaV10 e ao composto II revelou redução na viabilidade dos trofozoítos (valores de GI50 de cerca de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e afetou a aderência do parasita aos tubos de cultura de poliestireno e a uma monocamada de células Vero, mesmo em baixas concentrações.

Palavras-chave: Interação Parasito-hospedeiro, Vesículas extracelulares, *Giardia intestinalis*, Inibidores da Peptidilarginina deiminase, Canabidiol

ABSTRACT

Giardia intestinalis is a microaerophilic protozoan that is an important etiologic agent of intestinal infection worldwide, also known as the “traveler diarrhea”. There is evidence that under diverse conditions, the parasite is capable of shedding extracellular vesicles (EVs) which modulate the physiopathology of giardiasis. Here we describe new features of *G. intestinalis* EV production, revealing its capacity to shed two different enriched EV populations: large (LEV) and small extracellular vesicles (SEV) and identified relevant adhesion functions associated with the larger population. Proteomic analysis revealed differences in proteins relevant for virulence and host-pathogen interactions between the two EV subsets, such as cytoskeletal and anti-oxidative stress response proteins in LEVS. We assessed the effect of two recently identified inhibitors of EV release in mammalian cells, namely peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitor and cannabidiol (CBD), on EV release from *Giardia*. The compounds were both able to effectively reduce EV shedding, the PAD-inhibitor specifically affecting the release of LEVs and reducing parasite attachment to host cells *in vitro*. Our results suggest that LEVs and SEVs have a different role in host-pathogen interaction, and that treatment with EV-inhibitors may be a novel treatment strategy for recurrent giardiasis. In addition, the effects of sodium decavanadate (henceforth called NaV10), nicotinamide (compound I) and isonicotinamide (compound II) were investigated in *Giardia intestinalis* cells. Exposure of *Giardia* trophozoites to NaV10 and compound II revealed reduction in trophozoite viability (GI50 values of ca. 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and affected the parasite adherence to both polystyrene culture tubes and a monolayer of Vero cells, even at low concentrations.

Keywords: Host-pathogen interaction; Extracellular vesicles; *Giardia intestinalis*; Peptidylarginine deiminase inhibitor, Cannabidiol (CBD)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo de vida do protozoário flagelado <i>Giardia intestinalis</i>	23
FIGURA 2 – Biogênese das principais populações de vesículas extracelulares.....	25
FIGURA 3 – Deaminação proteica realizada pelas enzimas PAD, e a consequente liberação de vesículas extracelulares.....	28
FIGURA 4 - Isolamento e caracterização de duas populações distintas de VEs produzidas por <i>Giardia intestinalis</i>	39
FIGURA 5 - Os inibidores de VEs CI-amidina e CBD diminuem a produção de VELs secretadas por <i>G. intestinalis</i>	42
FIGURA 6 - VEs derivadas do parasito estão envolvidas de uma maneira seletiva com a adesão de <i>Giardia</i> com as células do hospedeiro.....	44
FIGURA 7 - Os subtipos de VEs de <i>Giardia intestinalis</i> diferem no cargo proteico..	45
FIGURA 8 - Análise bioinformática das proteínas de VELs e VEPs.....	45
FIGURA 9 - Análise bioinformática do conteúdo proteico das VEs.....	46
FIGURA 10 - As duas subpopulações de VEs do protozoário são internalizadas por células Caco-2.....	48
FIGURA 11 - Extração de RNA e análise bioinformática sugerem a presença de pequenos RNAs nas VEs totais do parasito.....	50
FIGURA 12 - Ensaio de microbicidade envolvendo trofozoitos de <i>G. intestinalis</i> e seus produtos.....	51
FIGURA 13 - As vesículas extracelulares de <i>Giardia intestinalis</i> possuem diferentes conteúdo proteico, e estão envolvidas de forma distinta na recuperação da adesão dos parasitos após tratamento com inibidores de VEs.....	56
FIGURA 14 - O tratamento de parasitos com albendazole estimula a liberação de vesículas extracelulares largas.....	69
FIGURA 15 - Parasitos resistentes a albendazole são capazes de liberar uma concentração maior de VELs.....	71
FIGURA 16 - VELs derivadas de trofozoitos WT tratados com albendazole (0.1 ou 0.2 µM) apresentam efeito citotóxico.....	72
FIGURA 17 - Estrutura química dos derivados de decavanadato.....	74
FIGURA 18 - Espectroscopia dos derivados de decavanadato.....	75
FIGURA 19 - Ensaio in vitro de adesão do parasito após efeito dos sais de decavanadato.....	76

FIGURA 20 - Cinética de desadesão dos trofozoitos a partir de uma superfície de poliestireno (após confluência de cultura) tratados com diluições seriadas de NaV10, produto I e II e albendazole.....	78
FIGURA 21 - Efeitos dos sais de decavanadato em co-culturas.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Conteúdo proteômico associado às VELs e VEPs.....	47
TABELA 2 – Cristalografia e dados de refinamento para produto I.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ABZ	- Albendazole
ATCC	- inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
AVS	- Antígenos Variáveis de Superfície
Caco-2	- Adenocarcinoma de cólon humano
CBD	- Canabidiol
CFSE	- Diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster
Cl-amidina	- Cloroamidina
DAPI	- 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DO	- Densidade óptica
DTT	- ditioneitol
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	- Ácido etilenoglicol tetra-acético
ESCRT	- Complexo de endereçamento endossomal necessário ao transporte
GI50	- Inibição do crescimento em 50%
HCT-8	- Adenocarcinoma ileocecal humano
IAA	- Iodoacetamida
ILV	- Vesículas intraluminais
MAPK	- Proteínas quinases ativadas por mitógenos
miRNA	- micro Ácido ribonucleico
MLC	- Concentração letal mínima
MOI	- inglês, <i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
MVB	- Corpos multivesiculados
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
NaV10	- Decavanadato de sódio
NMR	- Espectroscopia por Ressonância Magnética
NTA	- Rastreamento de nano-partículas
P	- Probabilidade de significância
PAD	- Peptidilarginina deiminases
PBS	- inglês, <i>Phosphate-buffered saline solution</i>

PES	- Produtos Excretórios-Secretórios
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PI3K	- Fosfatidilinositol 3-quinase
PKH-26	- inglês, <i>Red Fluorescent Cell Linker</i>
ppm	- Partes por milhão
R	- Parasitos resistentes ao albendazole
RISC	- inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i>
RPMI	- inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
rRNA	- Ácido ribonucleico ribossômico
SAB	- Soro adulto bovino
SFB	- Soro fetal bovino
TBE	- Tris/Borato/EDTA
tRNA	- Ácido ribonucleico transportador
UI	- Unidade Internacional
V10	- Decavanadato
VEEs	- Vesículas específicas de encistamento
VELs	- Vesículas extracelulares Largas
VEPs	- Vesículas extracelulares Pequenas
Vero	- Células de rim de macaco verde
VEs	- Vesículas extracelulares
VP	- Vesículas periféricas
WT	- inglês, <i>Wild-type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

- © - copyright
- ® - marca registrada
- ∏ - produto de números
- ∑ - somatório de números
- μg - microgramas
- μL - microlitros
- μM – micromolar
- Ca²⁺- Íon de cálcio
- Ca. – latim, *circa* (aproximadamente)
- M - molar
- mg/mL - miligramas/mililitros
- mL – mililitros
- mM – milimolar
- nL - nanolitros
- nm - nanômetro
- °C - graus Celsius
- ™ - marca comercial
- v/v - mL soluto/100 mL solução final
- xg - unidade de força relativa centrifugacional

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE VESÍCULAS	
EXTRACELULARES E INIBIDORES DE VESICULAÇÃO.....	18
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	21
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	84
1.3.1 ASPECTOS GERAIS DE GIARDIA INTESTINALIS.....	22
1.3.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES: BIOGÊNESE.....	24
1.3.3 INIBIDORES DE VESICULAÇÃO: INIBIDORES PAD.....	27
1.3.4 MICRORNAS: DEFINIÇÃO E PRESENÇA EM VES PARASITOS.....	28
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
1.4.1 ISOLADOS DE G. INTESTINALIS E CULTURAS CELULARES.....	30
1.4.2 ISOLAMENTO DE VES.....	30
1.4.3 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VES.....	31
1.4.4 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VES DE TROFOZOITOS INDUZIDOS E NÃO-INDUZIDOS AO PROCESSO DE ENCISTAMENTO.....	31
1.4.5 INVESTIGAÇÃO DE MICROBICIDADE: ENSAIO DE CO-INCUBAÇÃO DE TROFOZOITOS, VELS OU PRODUTOS DOS PARASITOS COM INOCULO BACTERIANO.....	31
1.4.6 TRATAMENTO DOS TROFOZOITOS COM INIBIDORES DE VES.....	32
1.4.7 CURVAS DE CRESCIMENTO DE TROFOZOITOS PÓS-TRATAMENTO COM INIBIDORES DE VES OU VESICULAÇÃO.....	32
1.4.8 ENSAIOS DE INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO EXPOSTOS AOS INIBIDORES DE VES.....	33
1.4.9 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE INIBIDORES DE PROTEASES NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO.....	33
1.4.10 PREPARO DE AMOSTRA PARA PROTEÔMICA DE VES COM ESPECTOMETRIA EM MASSA.....	34
1.4.11 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM NANO-FLUXO COM ESPECTOMETRIA DE MASSA.....	34

1.4.12	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	35
1.4.13	EXTRAÇÃO DE RNA E ELETROFORESE DE VES TOTAIS.....	35
1.4.14	SEQUENCIAMENTO MIRNAS, ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E BIOINFORMÁTICA.....	36
1.4.15	MARCAÇÃO DE VES COM CORANTES FLUORESCENTES.....	36
1.4.16	INTERNALIZAÇÃO DE VES DO PARASITE EM CÉLULAS MAMÍFERAS.....	36
1.4.17	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM INIBIDORES DE VES EM CÉLULAS CACO-2.....	37
1.4.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
1.5	RESULTADOS.....	38
1.5.1	GIARDIA INTESTINALIS É CAPAZ DE PRODUZIR DUAS POPULAÇÕES DISTINTAS DE VES.....	38
1.5.2	O TRATAMENTO COM INIBIDOR-PAD E CBD AFETAM A BIOGÊNESE DE VES EM GIARDIA.....	40
1.5.3	VELS DERIVADOS DO PARASITO, MAS NÃO SUAS VEPS, RESTORAM A ADESÃO DE TROFOZOITOS TRATADOS COM INIBIDORES DE VES.....	42
1.5.4	AS DIFERENTES POPULAÇÕES DE VES CONTÉM PERFIS DE PROTEÍNAS DISTINTOS.....	44
1.5.5	AS DUAS POPULAÇÕES DE VES SÃO INTERNALIZADAS POR CÉLULAS MAMÍFERAS.....	48
1.5.6	A ANÁLISE BIOINFORMÁTICA E SEQUENCIAMENTO SUGEREM A PRESENÇA DE PEQUENOS RNAS NAS VES DO PARASITO.....	49
1.5.7	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DE PARASITOS OU SEUS PRODUTOS IN VITRO.....	51
1.6	DISCUSSÃO.....	52
1.6.1	AS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO PARASITO SÃO INIBIDAS POR INIBIDORES DAS PEPTIDILARGININA DEIMINASES.....	53
1.6.2	AS DIFERENTES POPULAÇÕES DE VES APRESENTAM DIFERENTES CONTEÚDOS E EFEITOS FENOTÍPICOS.....	53
1.7	CONCLUSÃO.....	56
CAPÍTULO II - DROGAS ANTIPARASITÁRIAS E MECANISMOS DE		
RESISTÊNCIA A DROGAS ASSOCIADAS A VESICULAS EXTRACELULARES.57		
2.1	INTRODUÇÃO.....	57

2.2	OBJETIVOS.....	59
2.2.1	OBJETIVO GERAL.....	59
2.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
2.3	REVISÃO DE LITERATURA.....	60
2.3.1	TERAPIA CONTRA GIARDIA INTESTINALIS.....	60
2.3.2	DECAVANADATOS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	61
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.4.1	ISOLADOS DE GIARDIA INTESTINALIS E CULTURAS.....	62
2.4.2	ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VES.....	62
2.4.3	TRATAMENTO DE PARASITOS E CÉLULAS MAMÍFERAS COM VES....	63
2.4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS DECAVANADATOS.....	64
2.4.5	SÍNTESE DOS COMPOSTOS I E II.....	65
2.4.6	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE ÚNICO CRISTAL.....	65
2.4.7	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO E ADERÊNCIA EM TROFOZOITOS DE G. INTESTINALIS.....	66
2.4.8	INVESTIGAÇÃO DOS POLIOXIDOVANADATOS NA ADERÊNCIA DE PARASITOS EM TUBOS DE POLIESTIRENO.....	67
2.4.9	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO EM CO-CULTURAS.....	67
2.4.10	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DOS DECAVANADATOS EM CÉLULAS VERO.....	68
2.4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
2.5	RESULTADOS.....	69
2.5.1	O TRATAMENTO DE G. INTESTINALIS COM ALBENDAZOLE AUMENTA A PRODUÇÃO DE VESICULAS EXTRACELULARES LARGAS.....	69
2.5.2	PARASITOS RESISTENTES A ALBENDAZOLE APRESENTAM UMA LIBERAÇÃO MAIOR DE VELS.....	70
2.5.3	VELS DERIVADAS DE PARASITOS TRATADOS COM DROGA POSSUEM EFEITO CITOTÓXICO.....	71
2.5.4	SÍNTESE DOS DECAVANADATOS ASSOCIADOS COM HOMÓLOGOS ORGÂNICOS.....	72
2.5.5	ANÁLISES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DE CRISTAL ÚNICO.....	72
2.5.6	ESPECTROSCOPIA DAS SOLUÇÕES.....	74

2.5.7	OS EFEITOS DOS SAIS DE DECAVANADATO EM G. INTESTINALIS: ENSAIOS DE ADESÃO E CRESCIMENTO.....	75
2.5.8	O EFEITO DOS POLIOXIDOVANADATOS NA ADESÃO IN VITRO DOS TROFOZOITOS.....	77
2.6	DISCUSSÃO.....	80
2.7	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84

INTRODUÇÃO

Giardia intestinalis é um protozoário flagelado que habita o intestino delgado de vertebrados. Sua arquitetura celular não possui as organelas típicas do domínio *Eukarya*, tais como mitocôndria, peroxissomos ou complexo de Golgi. No entanto, é dotado por estruturas celulares únicas, tais como o disco ventral, que permite sua adesão ao epitélio intestinal (Adam, 2001; Cernikova et al., 2018). O patógeno é responsável pela infecção orofecal mais comum do planeta, a giardíase. Caracterizada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença negligenciada a partir de 2004, *G. intestinalis* é responsável pela infecção de 300.000.000 indivíduos por ano, provenientes de países industrializados, mas principalmente daqueles em desenvolvimento (Fink & Singer, 2017; Cernikova et al., 2018). O protozoário apresenta duas formas evolutivas: (1) cistos, forma infectante transmitida por água e alimentos e (2) trofozoítos, células vegetativas que, através do disco ventral, aderem-se ao epitélio do intestino delgado (Ma'ayeh et al., 2017). O ciclo de vida inicia-se após ingestão alimentos ou água contaminados por cistos. Apesar de uma biologia celular e ciclo de vida simples, o protozoário mantém uma complexa interação com seu hospedeiro, devido à variação antigênica (proteínas variáveis de superfície) e vários fatores de virulência secretados, tais como cisteína proteases, responsáveis pela disrupção do epitélio intestinal, produtos de oxidação e degradação de fatores da imunidade, como quimiocinas, que tornam *Giardia intestinalis* mais adaptada ao ambiente intestinal (Cotton et al., 2014; Liu et al., 2018; Bartelt & Sartor, 2015). O parasita também é capaz de evadir-se do sistema imune através de variação antigênica (Prucca et al., 2008; Serradell et al., 2016). Todavia, a patogênese ainda não é completamente conhecida. Finalmente, a infecção crônica é um aspecto comum na giardíase, e representa consequências no estado nutricional de crianças e imunocomprometidos. (Halliez & Buret, 2013; Bartelt & Sartor, 2015).

Ao longo da evolução, parasitas desenvolveram diferentes formas de evadir a resposta imunológica de seus hospedeiros, e também para comunicação celular. Dentre as estratégias de interação entre parasitas e seus hospedeiros, vesículas extracelulares representam uma importante forma de comunicação celular. Definidas como partículas bilipídicas secretadas por distintas linhagens celulares, as vesículas celulares podem ter diferentes origens, e ser de diferentes tipos. Já foram encontradas em vários fluidos biológicos e uma ampla variedade de modelos de

estudo, procarióticos e eucarióticos. Evans-Osses et al (2017) caracterizaram a produção de uma população de VEs do parasito, microvesículas, sob diversos estímulos, e sua capacidade em aumentar a adesão dos trofozoítos em epitélio intestinal *in vitro*. Ma'ayeh et al (2017) identificaram microvesículas de *Giardia* no secretoma de trofozoítos incubados com epitélio intestinal. Mesmo identificadas em diversos modelos, tais como câncer, doenças crônicas e infecciosas, há demanda para que vesículas extracelulares sejam sistematicamente estudadas. Existem diferentes populações de vesículas, e cada subtipo de vesícula extracelular pode apresentar um papel específico na interação celular.

Outro importante fator relacionado à persistência do parasita no hospedeiro é a sua resistência às drogas. Estudos identificaram populações de trofozoítos resistentes a diversos componentes utilizados para tratamento (Upcroft & Upcroft, 1998; Aguello-García et al., 2020). Algumas das drogas disponíveis para tratamento, como metronidazole e albendazole, apresentam efeitos adversos nos hospedeiros, tais como náusea, diarreia e cefaleia (Abboud et al., 2001).

O presente trabalho, apresentado em dois capítulos, aborda diferentes estudos relacionados à caracterização da produção de vesículas extracelulares de *Giardia intestinalis*, assim como um estudo de viabilidade celular após tratamento com compostos sintéticos. O capítulo I apresenta a capacidade do protozoário em produzir diferentes populações de vesículas extracelulares, efeitos fenotípicos após a diminuição da produção destas vesículas por tratamento com inibidores, assim como a investigação de efeitos fenotípicos de cada população. O capítulo II aborda estudos envolvendo a inibição de crescimento de trofozoítos pelo tratamento *in vitro* com derivados de decavanadato.

CAPÍTULO I - Caracterização de populações de vesículas extracelulares e inibidores de vesiculação

1.1 INTRODUÇÃO

O protozoário flagelado *Giardia intestinalis*, apresenta uma biologia celular simples, sem organelas típicas do domínio *Eukaria*, como mitocôndrias, complexo de Golgi e um complexo de endereçamento endossomal necessário ao transporte (ESCRT). O parasito acessa nutrientes através de estruturas chamadas vesículas periféricas (VP), e a secreção de proteínas do cisto é realizada por vesículas específicas de encistamento (VEEs), presentes nos trofozoitos em fase de encistamento (Saha et al., 2018; Gottig et al., 2006).

Adaptações do protozoário para sobrevivência no hospedeiro envolvem formas sofisticadas de comunicação patógeno-hospedeiro (Cipriano & Hajduk, 2018). Uma destas formas, bastante estudada na parasitologia nos últimos anos, é a interação dos parasitos através de vesículas extracelulares (VEs), que apresentariam um papel relevante na doença (Cwiklinski et al., 2015; Coakley et al., 2017).

VEs são partículas de 30-1000 nm envoltas em uma bicamada lipídica, liberadas a partir de várias linhagens celulares, e carregam biomoléculas, como proteínas, lipídios, glicoconjugados e material genético. São encontradas na maior parte dos fluidos biológicos, e devido ao conteúdo que carregam, participam de processos patofisiológicos (Coakley et al., 2015; Nawaz et al., 2016; Maas et al., 2017; van Niel et al., 2018; Ramirez et al., 2018; Ryu et al., 2018).

Nosso grupo descreveu a liberação de VEs por *G. intestinalis*, sugerindo a participação das vesículas na imunomodulação e persistência de trofozoitos no hospedeiro (Evans-Osses et al., 2017). Além disso, Ma'ayeh et al (2017) detectaram a presença de VEs no secretoma de culturas axênicas do parasito. Nos últimos anos, existe um interesse para aprimorar o conhecimento atual sobre a natureza, biogênese e constituição das diversas populações de VEs. Trabalhos das últimas décadas cunharam o termo “exossomos” para se referir às populações menores, as vesículas extracelulares pequenas (VEPs), de origem multivesicular (<100 nm de diâmetro). Concomitante, vesículas extracelulares largas (VELs) representadas principalmente por “microvesículas” (~100-1000 nm) são liberadas diretamente da membrana plasmática (Tkach et al., 2018; Mathieu et al., 2019). Desta forma, o

campo de pesquisa envolvendo as VEs debate a necessidade de distinguir os subtipos de VEs, e determinar sua relevância funcional (Tckach et al., 2018).

Existem determinadas limitações técnicas na análise de VEs, porém, a relação de tamanho e função biológica poderia ser um passo apropriado para a caracterização (Moyano et al., 2019). O enriquecimento de subpopulações de VEs a partir de amostras é realizado com centrifugações diferenciais: VELs são obtidas a velocidades menores do que 20.000xg, e VEPs são peletadas a 100.000xg, numa ultracentrifuga. Formalmente, microvesículas e exossomos seriam os principais representantes das VELs e VEPs, respectivamente. (Morrison et al., 2016; Nawaz et al., 2017). Diferentes papéis para estas VEs permanecem como um foco de investigações: seriam todas as VEs fenotipicamente relevantes e/ou similares?

A biogênese das VEs envolve diferentes componentes celulares. Os exossomos, as menores populações de VEs (<100 nm) são produzidas a partir de vias endocíticas específicas, que se iniciam com a produção dos diferentes complexos de ESCRT (0, I, II, III) na membrana de corpos multivesiculados (MVB), resultando na formação de vesículas intraluminais (ILV). Os exossomos são liberados a partir das ILVs (Mathieu et al., 2019). Outra população, as microvesículas (>100 nm) são formadas a partir de estímulos que liberam Ca^{2+} intracelular, reorganização do citoesqueleto com ativação de scramblases que translocam fosfatidilserina do folheto interno da membrana plasmática para a porção externa (Camussi et al., 2010).

Enquanto existem evidências que as VEs são liberadas por mecanismos múltiplos, alguns avanços sobre biogênese foram alcançados por estudos envolvendo a via das peptidilarginina deiminases (PAD) em diversos táxons (Kholia et al., 2015; Kosgodage et al., 2017; Lange et al., 2017; Kosgodage et al., 2018; Kosgodage et al., 2019). PADs são enzimas filogeneticamente conservadas, de bactérias a mamíferos (Vossenaar et al., 2003; Magnadottir et al., 2018; Kosgodage et al., 2019), incluindo *Giardia* (Trejo-Soto et al., 2016). PADs catalisam deaminações pós-traducionais, alterando os resíduos de arginina em citrulina numa forma irreversível, afetando forma e função proteica (Vossenaar et al., 2003; György et al., 2006). PADs estão envolvidas em processos patofisiológicos e sua regulação está associada ao aumento de proteínas deaminadas em vários modelos, incluindo doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas e câncer. (Vossenaar et al., 2003; Wang & Wang 2013; Witalison et al., 2015; Lange et al., 2017; Kosgodage et

al., 2018; Uysal-Onganer et al., 2020). Enquanto os papéis específicos de PADs na biogênese de VEs ainda deva ser esclarecido, efeitos nas proteínas do citoesqueleto, núcleo e mitocôndria já foram reportados (Kholia et al., 2015; Kosgodage et al., 2018; Uysal-Onganer et al., 2020). Uma classe de inibidores sintéticos, os inibidores-PAD foram previamente associados como potentes inibidores de VEs em vários tipos de câncer e bactérias (Kholia et al., 2015; Kosgodage et al., 2017; Kosgodage et al., 2018; Kosgodage et al., 2019).

Em adição, canabidiol (CBD), um fitocanabinóide derivado de *Cannabis sativa* (Mechoulam et al., 2002), foi associado como um potente inibidor de VEs em modelos de câncer e bactérias (Kosgodage et al., 2018, Kosgodage et al., 2019), indicando uma função conservada na regulação de VEs. Canabinóides já foram associados com funções anti-parasitárias (Nok et al., 1994, Croxford et al., 2005; Roulette et al., 2016) e redução de resistência bacteriana a drogas via inibição de VEs (Kosgodage et al., 2019).

Neste trabalho, reportamos a produção de duas populações distintas de VEs por *Giardia intestinalis*, que diferem no tamanho e função. A população maior apresentou um efeito significativo na adesão do parasito in vitro, e foi significativamente inibida pelo tratamento com inibidores-PAD e CBD.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Caracterização das populações de vesículas extracelulares produzidas pelo protozoário *Giardia intestinalis*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Estudar a liberação de VEs de trofozoítos de *G. intestinalis* em diferentes condições.
- Comparar VEs obtidos de trofozoítos, e VEs de trofozoítos induzidos ao processo de encistamento.
- Investigação de efeito microbicida com a co-incubação de trofozoítos, seus produtos ou VELs com *Escherichia coli*.
- Estudo in vitro da interação patógeno-hospedeiro após tratamento com inibidores-PAD e CBD.
- Investigação da internalização in vitro de vesículas marcadas com fluorocromos em células Caco-2.
- Análise proteômica por cromatografia líquida em nano-fluxo e espectrometria de massa das populações de vesículas extracelulares.
- Investigação da presença de ácidos nucleicos nas vesículas extracelulares totais, e análise bioinformática do conteúdo. Diferenciação das subpopulações de vesículas extracelulares baseando-se em Análise de rastreamento de partículas, e quantificação proteica
- Análise da produção de vesículas extracelulares após tratamento com inibidores-PAD e CBD.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

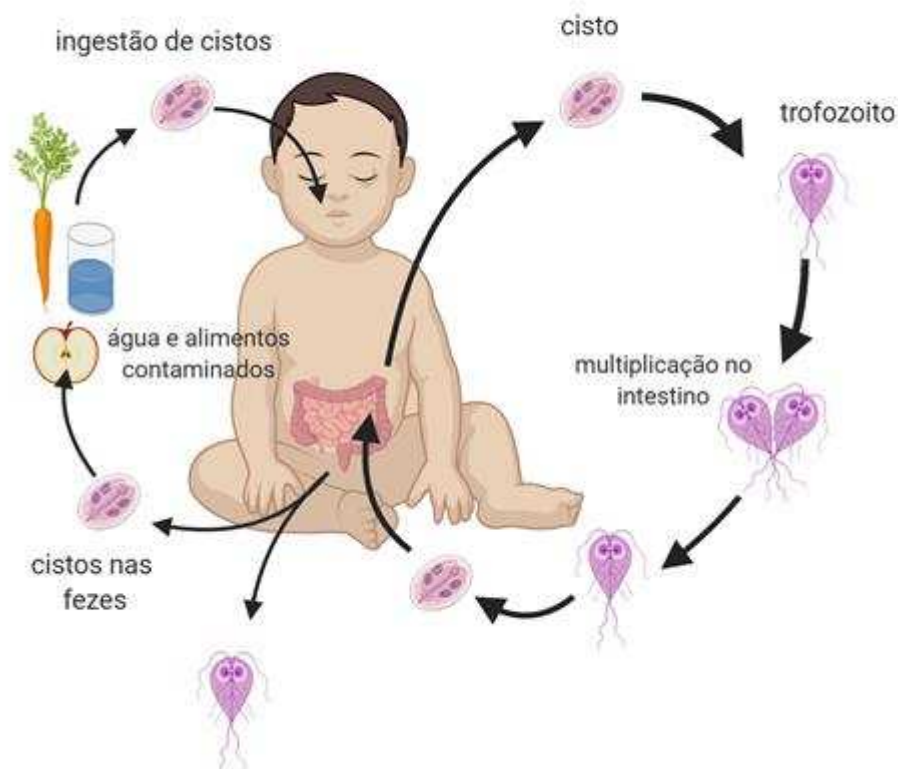
1.3.1 Aspectos gerais de *Giardia intestinalis*:

Giardia intestinalis é um patógeno intestinal de humanos e animais. Foi descrito pela primeira vez pelo microscopista holandês Anton van Leeuwenhoek, a quem se credita o início da microbiologia como ciência (Adam, 2001, Argüello-García et al., 2020). Pertence ao filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophora (Cavalier Smith, 1993), ordem Diplomonadida (Wenyon, 1926 emend Brugerolle, 1975) e família Hexamitidae (Thompson & Moris, 2014). Sua biologia celular é simples, e nos últimos 100 anos houve divergências e especulações quanto à taxonomia e sua relação filogenética. Estudos moleculares demonstram que as características o definem como um eucarioto primitivo, como a ausência de mitocôndria, complexo de Golgi e peroxissomos típicos. Estima-se que isso seja devida à perda secundária evolutiva destas estruturas, e não pela divergência de um ancestral eucarionte anterior à aquisição destas estruturas (Embley & Hirt, 1998; Hashimoto et al., 1998; Cernikova et al., 2018). É um protozoário flagelado que possui organelas organizadas em pares, como dois núcleos diploides, estruturas similares a mitocôndrias (mitossomos) e uma estrutura única, o disco ventral (Argüello-García et al., 2020). Esta organela, composta de microtúbulos e microfilamentos, é responsável pela sua adesão ao hospedeiro, e o distingue dos membros da Hexamitidae (Thompson & Monis, 2014). É um organismo microaerófilo, de capacidade metabólica minimalista, e por não apresentar uma mitocôndria típica e enzimas como catalase e glutathione peroxidase, sua obtenção de energia é primariamente realizada por glicólise, e pela via da arginina di-hidrolase (Einarsson et al., 2016). O parasito apresenta um sistema simplificado de endomembranas, compartimentos que se dividem em: retículo endoplasmático, vesículas periféricas (VP) e vesículas específicas de encistamento (VEE), presentes apenas em parasitos em processo de encistamento. Este sistema é uma interface responsável por endo e exocitose de materiais em fase fluida, fundamentais para a sua nutrição (Cernikova et al., 2018; Midlej et al., 2019). *G. intestinalis* apresenta dois estágios evolutivos, estruturas claramente distinguíveis por microscopia: o trofozoito, forma vegetativa que se adere à barreira intestinal, e que se multiplica por fissão binária, e o cisto, forma infecciosa liberada ao ambiente pelas fezes (Figura 1). A ingestão de água ou alimentos contaminados leva à giardíase, uma das diarreias mais comuns pelo mundo, com uma estimativa de 300 milhões de casos

reportados por ano. O maior número de indivíduos infectados ocorre em países em desenvolvimento, devido à piores condições sanitárias. Desde 2004, encontra-se no grupo das Doenças Negligenciadas (Einarsson et al, 2016).

Embora a manifestação clínica seja comum apenas em crianças e indivíduos imunocomprometidos, a patogênese da giardíase ainda não é totalmente compreendida, possibilitando episódios de diarreia crônica e inflamatória (Cotton et al., 2015). Os cistos são eliminados pelas fezes em grande quantidade (300 milhões a 14 bilhões por dia), ocorrendo períodos de interrupção de eliminação de sete a 10 dias. Os trofozoítos também podem estar presentes nas fezes, mas são os cistos os responsáveis pela transmissão. Os cistos resistem fora do hospedeiro, sobrevivendo em água doce e fria (Adam, 2001).

Figura 1- Ciclo de vida do protozoário flagelado *Giardia intestinalis*.



Fonte: O autor (2020).

A persistência do protozoário no hospedeiro é multifatorial, e a complexa interação do protozoário com seu hospedeiro é também devido à excreção de vários produtos parasitários, como (I) cisteína proteases, que realizam a disrupção do epitélio intestinal, apoptose de enterócitos e degradação de quimiocinas, (II) Cathepsina-B, que diminui o recrutamento de neutrófilos e (III) Carbamoyl-transferase, que degrada espécies reativas de oxigênio presentes na mucosa intestinal (Cotton et al., 2014; Ansell et al., 2016; Revisado por Allain et al., 2019).

O secretoma do parasito já foi estudado em interações parasito-hospedeiro in vitro e in vivo. Cotton e colaboradores (2014) estudaram in vitro a interação dos trofozoitos com bactérias gram-negativas, e observaram disrupção do biofilme e da barreira epitelial. O mesmo grupo em 2017 investigou a co-incubação de *G. muris* com um enteropatógeno. Os parasitos estimularam células eucarióticas a secretarem peptídeos antimicrobianos e trefoil fator-3, diminuindo invasão bacteriana. Bartealt et al (2017) desenvolveram um modelo de estudo in vivo para estudo de infecções com *Giardia* em camundongos com deficiência proteica. Animais infectados com o parasito modificaram a microbiota intestinal, com uma proporção maior de *Enterobacteriaceae*, e apresentaram um atraso no crescimento. A adesão in vitro de trofozoitos em células de adenocarcinoma ileocecal humano (HCT-8) evidenciaram que *G. intestinalis* pode induzir apoptose. A co-inbucação de parasitos e células mamíferas resultou em condensação da cromatina de células HCT-8, e ativação de caspase-3 (Koh et al., 2013). O mesmo efeito foi observado na incubação com extratos de parasitos.

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), o tratamento da giardíase é realizado com secnidazole, albendazole tinidazole ou metronidazole. A filtração da água potável, educação sanitária e adequação das condições sanitárias constituem-se as principais medidas profiláticas.

1.3.2 Vesículas extracelulares: biogênese

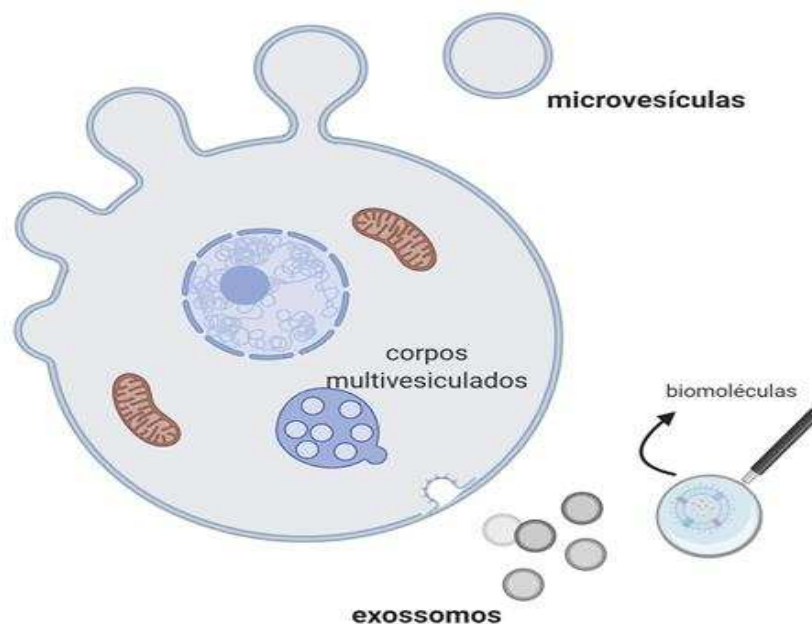
As adaptações dos parasitos em seus hospedeiros são realizadas através de complexas formas de comunicação. Relações evolutivas entre os dois envolvem diversos tipos de contato, como a interação por vesículas extracelulares (Cwiklinski et al., 2015; Coakley et al., 2017; Gavinho et al., 2018).

As vesículas extracelulares (VEs) são partículas liberadas por células, e são capazes de transportar uma variedade de biomoléculas, como proteínas, ácidos

nucleicos, antígenos, glicoconjugados, participando da comunicação celular em eventos patofisiológicos (Tkach et al., 2018; Mathieu et al., 2019). Assim, formam um grupo heterogêneo de vesículas, reconhecidas por diferentes nomes, como micropartículas, microvesículas, ectossomas, exosomas e oncosomas, com tamanhos que variam entre 40-1000 nm (Revenfeld et al, 2014; Evans-Osses et al, 2015).

Devido às diferenças na biogênese, VEs podem ser divididas em subpopulações, conforme a Figura 2, cada uma com características específicas e possíveis funções biológicas (Revenfeld et al, 2014). Exosomos, as menores populações (<100 nm) são continuamente produzidas no endossomo tardio, e liberadas pela fusão dos corpos multivesiculados à membrana plasmática. Microvesículas são partículas de maior tamanho (100-1000 nm), e que são liberadas por brotamento a partir da membrana plasmática, numa atividade cálcio-dependente (Morrison et al., 2016; Mathieu et al., 2019). Um dos maiores interesses dos pesquisadores envolvidos com VEs é a pesquisa de funções associadas a diferentes subpopulações (Tkach et al., 2018).

Figura 2 – Biogênese das principais populações de vesículas extracelulares



Fonte: O autor (2020).

A produção de VEs também já foi descrita para vários modelos de parasitos: tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* (Cestari et al, 2012, Wyllie & Ramirez, 2017), *Plasmodium* (Nantakomol et al., 2011) e *Toxoplasma gondii* (Pope & Lasser, 2013). Durante a evolução de protozoários parasitas, algumas espécies desenvolveram estratégias diferentes para a invasão de diferentes hospedeiros. Alguns patógenos, desta forma, infectam células da imunidade, ou se evadem da resposta imune pela produção de VEs (Gavinho et al., 2018). As subpopulações de VEs, portanto, estão envolvidas com imunomodulação, virulência e patogênese (Atayde et al., 2015). De acordo com Coakley et al (2015), as VEs não apenas permitem comunicação patógeno-hospedeiro, mas um modo de interação entre os parasitos.

Atayde e colaboradores (2015) demonstraram a formação de exossomos de populações de *Leishmania* que residem no vetor. Uma análise proteômica identificou fatores pro-inflamatórios nas VEs, e a produção de exossomos foi fundamental para a infecção pelo protozoário. Mantel et al (2013) sugerem que microvesículas são liberadas em grande quantidade por eritrócitos infectados por *P. falciparum*, regulando a diferenciação de estágios evolutivos do parasito associados à transmissão. As VEs contribuíram significativamente ao recrutamento de neutrófilos.

Dentre as biomoléculas encontradas nas VEs, há um interesse em identificar o potencial de regulação gênica em células receptoras, pela presença de microRNAs em exossomos e microvesículas (Buck et al., 2014; Mathieu et al., 2019). Os microRNAs tem como alvo genes específicos de células recipientes, e que podem modular a interação patógeno-hospedeiro. Buck et al (2014) demonstraram a presença de MicroRNAs em VEs em um modelo de helminto, e desta forma, um ensaio de infecção in vitro com tratamento envolvendo VEs demonstrou a regulação de genes associados à imunidade e inflamação em camundongos.

1.3.3 Inibidores de vesiculação: Inibidores PAD

A liberação de VEs é realizada por múltiplos mecanismos. Todavia, alguns avanços na compreensão da biogênese destas partículas já foram realizados, devido à estudos envolvendo as peptidilarginina deiminases (Kholia et al., 2015; Kosgodage et al., 2017). As peptidilarginina deiminases (PAD) são um grupo de enzimas conservadas de bactérias a mamíferos, e catalisam deaminações pós-traducionais pela alteração cálcio-mediada e irreversível de resíduos de arginina em

proteínas-alvo (Voseenaar et al., 2003; Magnadottir et al., 2018). Em humanos, já foram descritas 5 isoenzimas da família, que compartilham aproximadamente 50% de homologia (Jones et al., 2009). A alteração do aminoácido resulta num aumento da hidrofobicidade local, afetando a conformação proteica e sua função. Desta forma, já foi descrito que proteínas do citoesqueleto e membrana modificadas pelas enzimas causam uma desestabilização da estrutura celular, resultando na liberação das VEs (György et al., 2006; Kosgodage et al., 2017). Li et al (2008) descreveram a via bioquímica envolvida com a deaminação das proteínas do citoesqueleto, e a formação de VEs a partir do processo (Figura 3).

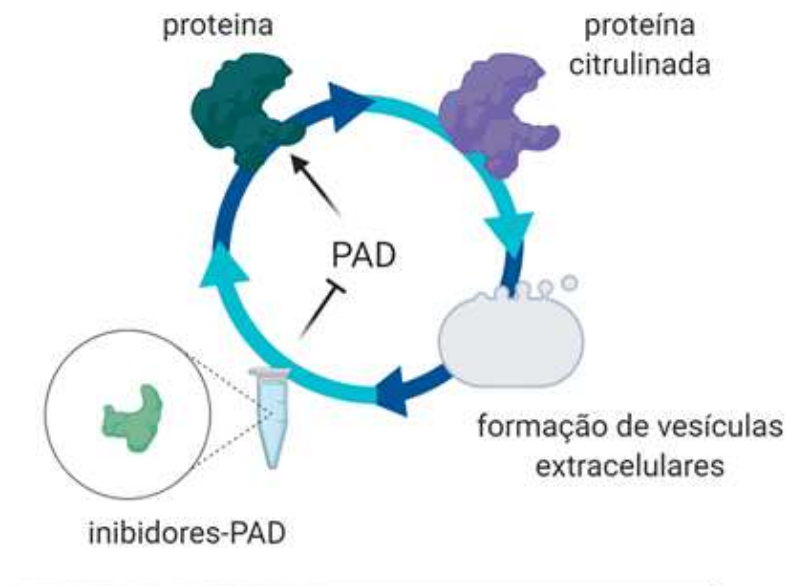
PADs estão envolvidas em eventos patofisiológicos, e intimamente relacionados à processos de deaminação em várias patologias, como doenças crônicas, degenerativas e câncer (Wang and Wang 2013; Witalison et al., 2015). Estudos envolvendo animais transgênicos com deficiência de PADs, assim como a síntese de inibidores destas enzimas esclareceu o papel das proteínas-alvo em diversos modelos de doenças (Lewis & Nacht, 2016).

Os primeiros inibidores-PAD sintetizados foram reconhecidas como moléculas de primeira geração, como a F-amidina (Luo et al., 2006). Sua produção baseou-se no desenvolvimento de moléculas homólogas ao substrato das PAD, porém a falta de doadores de prótons e diferenças finais de carga na molécula levaram grupos de pesquisa a pesquisarem outros compostos para a inibição. Desta forma, a produção de uma cetona fluorometil, representada pela F-amidina, apresentou resultados em estudos in vivo e in vitro significativos na inibição da PAD4 (Luo et al., 2006). Desta forma, novos inibidores foram sintetizados, como a Cl-amidina, um inibidor com maior potencial inibitório na formação de VEs do que a molécula antecessora (Kosgodage et al., 2017). Outros inibidores-PAD já foram associados para o estudo in vitro de processos inflamatórios e patológicos em diferentes modelos (formação de *Extracellular traps* de neutrófilos, artrite, aterosclerose, câncer) como YW3-56, YW4-03 e 2CA (revisado por Lewis & Natch, 2016).

Kholia e colaboradores (2015) sugerem que a liberação de VEs em células tumorais é mediado majoritariamente pela via PAD. Desta forma, o tratamento com os inibidores induziria uma sensibilidade das linhagens tumorais ao tratamento. Um efeito similar foi identificado para o estudo da liberação de VEs em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O tratamento das duas espécies com inibidores-PAD de

primeira e segunda geração (Cl-amidina, BB-Cl-amidina, respectivamente) diminuiu a produção de VEs, assim como sensibilidade a tratamentos com antibióticos. Curiosamente, detectaram-se proteínas deiminadas nas VEs procariontes, sugerindo uma transferência horizontal de proteínas deaminadas entre células bacterianas (Kosgodage et al., 2019).

Figura 3 – Deaminação proteica realizada pelas enzimas PAD, e a consequente liberação de vesículas extracelulares.



Fonte: O autor (2020).

1.3.4 MicroRNAs: definição e presença em VEs parasitos

Após a expansão das diferentes tecnologias ômicas, nas últimas décadas houve uma maior compreensão do papel dos RNAs no metabolismo celular e na doença. Além dos subtipos “clássicos” de RNA, envolvidos na síntese de proteínas, como o RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossômico (rRNA) e RNA transportador (tRNA), nas últimas décadas moléculas de diferentes tamanhos de RNA foram

associadas a funções regulatórias (Großhans & Filipowicz, 2008). Chamados coletivamente de pequenos RNAs, vários subtipos foram descritos em plantas, vírus e animais (Lewis et al., 2005). De forma geral, os pequenos RNAs mediam seletivamente o silenciamento de genes específicos, interferindo diretamente na via de síntese de proteínas. A classe de pequenos RNAs mais conhecida atualmente são os microRNAs (miRNAs), segmentos de 21 nucleotídeos de comprimento produzidos pelo genoma de espécies que, através de hibridizações com proteínas, formam complexos chamados RISC (RNA-induced silencing complex) capazes de impedir a expressão e regulação de mRNAs. Em mamíferos, já foi demonstrado que atuam predominantemente pela região *seed* (nucleotídeos 2-8 da região 5' terminal) com as regiões 3' não-traduzidas dos mRNAs, induzindo desestabilização e inibição da translação (Filipowicz et al., 2008).

A via canônica de regulação gênica por pequenos RNAs inicia-se quando a endonuclease III chamada Dicer associa-se no citoplasma com membros de proteínas da família Argonata, compondo um complexo pré-RISC. Um RNA é clivado pelo Dicer, formando duas diferentes fitas de RNA fita dupla-proteína. Dentre os dois segmentos, uma fita será selecionada como guia (segmento ativo), e incorporado ao complexo Argonata para formar o Risc. Este complexo Risc ativo reconhecerá um alvo específico por pareamento de bases entre a fita guia de RNA e o mRNA alvo (Song & Rossi, 2017). Os miRNAs podem induzir a repressão da tradução, marcar alvos para degradação por deadenilação, ou o sequestro de mRNAs para corpúsculos citoplasmáticos. Buck et al (2014) demonstraram a presença de VEs encapsulando conjuntos de microRNA, e que assim estariam protegidos da degradação. Estes produtos regularam os genes de camundongos associados à imunidade e inflamação. Assim, concluíram que helmintos são capazes de secretarem moléculas imunomodulatórias. Além disso, VEs são capazes de iniciar uma comunicação mediada por RNA entre espécies animais. Sotillo et al (2020) revisaram famílias de miRNAs em VEs de diversos helmintos, que poderiam ser utilizadas como marcadores. Liu et al (2019) identificaram a presença de miRNAs em VEs de *Schistosoma japonicum*, e ensaios in vivo envolvendo camundongos demonstram uma inibição da proliferação de monócitos e Fator de Necrose Tumoral, fatores necessários à sobrevivência do parasito.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Isolados de *G. intestinalis* e culturas celulares

Trofozoitos WB de *G. intestinalis* (ATCC 50803) foram mantidos no meio TYI-S-33 completo (Keister, 1983), suplementados com 10% de soro adulto bovino inativado (SAB, Ciprion™), 1% Penicilina/Estreptomicina (1000 U, Gibco™) e 0.5 mg/mL de bile bovina (ThermoFisher™), a 37°C em condição microaerófila. As culturas foram mantidas num volume final de 13 mL, em tubos de poliestireno (BD Biosciences™) até confluência (1×10^6 células/mL), e repicadas a cada 72 horas. Células de adenocarcinoma colo-retal humana, células Caco-2 (ATCC CRL-2102) foram mantidas em meio RPMI-1640 (Gibco™) suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 mM γ -glutamina e 1% Penicilina/Estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ até atingir confluência celular.

1.4.2 Isolamento de VEs

Para isolamento de VEs do parasito, trofozoítos oriundos de culturas confluentes foram desaderidos ao manter os tubos de cultura por 15 minutos no gelo. Depois, as culturas foram centrifugadas duas vezes (600xg/5min) e cada pellet suspenso com meio TYI-S-33 sem SAB. Parasitos foram contados utilizando um hematocítômetro, e diluídos a 1×10^6 por amostra, de acordo com Evans-Osses et al (2017). As amostras foram distribuídas em microtubos de 1.5 mL, num volume final de 1 mL, com adição de 1mM CaCl₂ para indução de vesiculação. Os microtubos foram mantidos sob incubação a 37°C, por 1 hora. Depois, pellets de VEs foram coletadas nas seguintes centrifugações: 600xg/5 min, e depois 4000xg/30 min para eliminar o debris celular. Em seguida, o sobrenadante era centrifugado à 15,000xg por 1 hora, e o pellet resultante (VELs) era suspenso em solução tampão salina (PBS 1x). O sobrenadante remanescente era ultracentrifugado a 100,000xg por 4 horas, e o pellet resultante (VEPs) era também suspenso em PBS (1x), sendo descartado o sobrenadante. Ambas as amostras foram mantidas a 4°C até uso.

Para purificação de VEs de células mamíferas, células Caco-2 foram cultivadas em frascos T25 até confluência, e o meio foi removido. Culturas foram lavadas (2x) com meio fresco RPMI-1640, e mantidas por 1 hora na presença de CaCl₂ (1 mM) para coletar vesículas extracelulares liberadas. Foi utilizado meio de cultura sem soro fetal bovino, para evitar contaminação com possíveis VEs

presentes no soro). O sobrenadante foi processado da mesma maneira descrita para recuperação de VEs do parasito. As VEs de Caco-2 foram mantidas a 4°C até uso para os ensaios de interação parasito-hospedeiro.

1.4.3 Quantificação e caracterização de VEs

VEs foram quantificados baseando-se no método de quantificação protéica, com a técnica de Micro BCA (ThermoFisher™). Para análise de rastreamento por nano-partículas (*Nanoparticle tracking analysis*, NTA, Nanosight, Malvern™) cada amostra foi diluída 1:100 em PBS (1x) e submetida ao Nanosight NS3000, com leituras realizadas em triplicada durante 60 segundos, com vídeos de 10 frames/segundo, temperatura ambiente. Os seguintes parâmetros de operação foram padronizados para cada amostra: obturador de câmera (1492), ganho de câmera (512), limite de detecção (10).

1.4.4 Comparação da produção de VEs de trofozoitos induzidos e não-induzidos ao processo de encistamento.

Em ensaios independentes, avaliou-se a produção de microvesículas de parasitos submetidos ao protocolo de encistamento in vitro (Sun et al., 2003). Uma densidade de 5×10^5 trofozoitos/mL foram dispensados em tubos de poliestireno com 13 mL TYI-S-33 suplementados com 10% SAB e mantidos por 24 horas a 37°C. Após centrifugação dos tubos (600xg/5 min.) o pellet contendo trofozoitos foi resuspendido com um meio pré-aquecido de indução de encistamento (50 mL ácido láctico, 12.5 g bile bovina em meio TYI-S-33, volume final de 1L). Após 24 horas, os trofozoitos são visualizados em microscópio optico (determinados parasitos apresentam VEE). Os parasitos foram centrifugados (600xg/5min), e ajustados para 1×10^6 células/mL em microtubos, e submetidos ao protocolo de produção de VEs. Em forma paralela, foram observadas a presença de cistos, demonstrando haver a indução do processo de encistamento.

1.4.5 Investigação de microbicidade: ensaio de co-incubação de trofozoitos, VELs ou produtos dos parasitos com inoculo bacteriano

Realizou-se uma co-incubação de trofozoitos e *Escherichia coli* (ATCC 25922) em placa de 96 poços. Foi utilizado um volume final de 100 µL de meio triptona, com uma densidade de 1.000.000 células bacterianas/poço. Foi preparado

um inoculo com uma densidade óptica de 0,001, com leitura a 600 nm (ELX 800 BIO-TEK Instruments™) e utilizado uma cultura bacteriana em fase log. Na placa de 96 poços, foi adicionado 90 µL de meio contendo o inoculo bacteriano na DO 0,001 + 10 µL das amostras de cada grupo. A placa foi incubada a 30°C/120 rpm com leitura de 18h após a 600 nm. A porcentagem de inibição é estabelecida a partir do controle (100% crescimento). Foram utilizados os seguintes grupos: controle (meio PB), tratamento com VELs (40 µg); tratamento com sobrenadante livre de VEs ou produto excretório-secretório (concentração do meio de cultura em fase log em speedvac, modelo Savant™ SPD1010).

Em experimento independente, foram co-incubados trofozoitos em fase de crescimento logarítmica e células bacterianas. Os protozoários foram incubados em 3 diferentes concentrações (37°C), realizando-se leitura da placa em 600 nm em intervalos de 3 horas (0, 3, 6). Cada grupo foi composto por pelo menos três replicatas biológicas, perfazendo uma duplicata experimental. Os grupos são: apenas meio (100 µL meio triptona), controle (100 uL inóculo bacteriano), MOI 100:1 (células bacterianas e 10000 trofozoítos), MOI 30:1 (células bacterianas e 30000 trofozoítos) e MOI 10:1 (células bacterianas e 100.000 trofozoítos).

1.4.6 Tratamento dos trofozoitos com inibidores de VEs

Inóculos de 10^6 trofozoitos em fase de crescimento logarítmico por grupo (triplicatas) foram estimulados com 1mM de CaCl_2 , em microtubos de 1.5 mL para a produção de VEs, com ou sem inibidores de VEs. Os grupos experimentais foram os seguintes: apenas meio TYI-S-33 (controle negativo), 100 ou 50 µM do inibidor PAD Cl-amidina (um presente do prof. Paul Thompson, UMASS), 10 ou 5 µM CBD (90899_SIAL, Sigma-Aldrich™). Após 60 minutos de incubação (37°C), sobrenadantes foram processados da mesma forma que protocolo descrito para isolamento de VEs.

1.4.7 Curvas de crescimento de trofozoitos pós-tratamento com inibidores de VEs ou vesiculação

Uma curva de crescimento foi iniciada com parasitos submetidos à vesiculação em diferentes intervalos de tempo (1,3 ou 6 horas). Parasitas submetidos a vesiculacao foram imediatamente lavados, centrifugados e ressuspensos. Inóculos de 10^5 trofozoitos (100 µL) de cada grupo foram

suspendidos em meio TYI-S-33 completo, adicionados a tubos de poliestireno até 13 mL, e mantidos a 37°C por um período de 96 horas. A cada 24 horas, os tubos eram resfriados no gelo por 15 minutos para a soltura dos trofozoitos, e alíquotas de 10 µL foram colhidas para quantificação de parasitos usando o hematocitômetro, sob um microscópio óptico Bioval.

Utilizando o mesmo protocolo, também foram realizadas curvas de crescimento de parasitos tratados com Cl-amidina (100 µM), Canabidiol (10 µM) ou mantidos apenas no meio (controle). A cada 24 horas, os tubos eram resfriados no gelo para a soltura dos parasitos, e contados como o protocolo acima.

1.4.8 Ensaio de interação parasito-hospedeiro expostos aos inibidores de VEs

Células Caco-2 foram semeadas em placas de 24 poços, e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com SFB até a total confluência. Inóculos de 5×10^5 trofozoitos/grupo foram transferidos à monocamada por 3 horas (37°C), num volume final de 1mL/poço. Os seguintes grupos foram investigados: apenas meio (controle), 10 µM CBD, 100 µM Cl-amidina. Após a incubação, a quantificação de trofozoitos foi realizada pela centrifugação de parasitos não-aderentes do sobrenadante, e contagem de células a partir do pellet, utilizando um hematocitômetro. A porcentagem de trofozoitos aderidos às células Caco-2 foi calculada de acordo com Cotton et al (2014). Num experimento independente, VEs foram inativadas por calor (65°C/30 min), como descrito em Salomon et al (2014), e utilizadas como controle negativo de VEs para tratamento de trofozoitos com ou sem exposição à 100 µM de Cl-amidina.

Os experimentos de interação parasito-hospedeiro também foram conduzidos utilizando-se as duas populações diferentes de VEs. Nestes casos, as co-culturas foram tratadas com 7 ou 14 µg de VELs, 7 ou 14 µg de VEPs. Num experimento independente, trataram-se trofozoitos com agentes quelantes (5mM EDTA ou EGTA), ou com um inibidor da via fosfatidil-inositol-3-kinase, wortmanina (100nM). Os compostos foram utilizados com ou sem 100 µM Cl-amidina.

Para verificar os efeitos de VEs de células mamíferas na adesão de trofozoitos, foram realizados ensaios de interação descritos acima. Os grupos experimentais foram os seguintes: 7 ou 14 µg (concentrações relacionadas à produção de VEs de 5×10^5 e 1×10^6 células, respectivamente) de VEPs derivadas de

células Caco-2, 7 ou 14 μg de VEs derivadas de células Caco-2, e o controle negativo utilizando apenas meio RPMI-1640.

1.4.9 Investigação da influência de inibidores de proteases na interação parasito-hospedeiro

A influência de inibidores de protease na interação parasito-hospedeiro foi investigada semeando 5×10^5 trofozoitos em monocamadas de células Caco-2 a 37°C . A co-cultura foi tratada com 1mM de iodoacetamida (IAA, um inibidor de cisteína protease), com ou sem 3.5 μg de VEs, por 3 horas, e o controle negativo com apenas meio RPMI-1640. A estimativa de adesão de trofozoitos foi realizada segundo os ensaios de adesão parasito-hospedeiro descritos acima.

1.4.10 Preparo de amostra para proteômica de VEs com espectrometria em massa

As amostras de VEs foram suspensas em 8M de uréia contendo um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich™). Amostras foram sujeitas à seis ciclos de congelamento-e-descongelamento antes de quantificação pelo método fluorométrico Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante. Um total de $\pm 100 \mu\text{g}$ foi reduzida com 10 mM ditioneína (DTT) a 30°C por 45 minutos, seguindo de alquilação de resíduos de cisteína com 40 mM de IAA por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as amostras foram incubadas com 5 mM de DTT por 15 minutos, a 30°C . As amostras foram digeridas com tripsina (Promega™, Cat#: V5111) por 18 horas a 30°C . Seguindo a digestão, todas as reações foram acidificadas com 10% (v/v) de ácido trifluoroacético (1% v/v concentração final) para parar a proteólise. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $12,000 \times g$ para remover materiais insolúveis. Os peptídeos tripticos foram dessalicados previamente à análise de espectrometria em massa, usando 2 discos C18 (3 M Empore™).

1.4.11 Cromatografia líquida em nano-fluxo com espectrometria de massa

A análise de cromatografia líquida em nano-fluxo acoplada a espectrometria de massa foi realizada usando-se o cromatógrafo Easy nano LC1000 (Thermo™) com o LTQ Orbitrap Velos (Thermo™), em que 10 nL μL de amostra foram aplicados usando um fluxo de 300 nL/min de fase Móvel A (5% ACN 0.1% ácido

fórmico) em uma coluna EASY C18 (2 cm x 5 µm x 100 µm; 120 Å pore, Thermo™) e separadas numa PepMap PicoFrit C18 (10 cm x 10 µm x 75 µm; 135 Å pore, New Objective™), num período de 105 minutos usando um gradiente linear 2-30% de fase Móvel B (100% ACN; 0.1% ácido fórmico). Os peptídeos eluídos foram ionizados usando um electrospray. Os 20 íons-precursosos mais intensos (estados de carga =2) foram fragmentados usando um CID à colisão de energia normalizada igual à 35, e tempo de ativação igual a 10 ms. O scanner ms foi padronizado entre 350-1500 m/z, com resolução de 60.000, a contagem de íon MS1 foi 1×10^6 e de MS2 foi 3×10^4 . Os experimentos foram analisados em triplicata biológica.

1.4.12 Identificação de proteínas

Arquivos brutos foram importados para a versão do MaxQuant 1.5.3.8 com máquina de procura Andromeda, e procurados para a database Uniprot *Giardia intestinalis* estirpe ATCC 50803 clone WB C6 (versão novembro, 2019, 7.156 entradas), com 20 ppm para MS/MS. Os seguintes parâmetros foram usados: carbamidometilação de cisteína (57.021464 Da) como modificação fixa, oxidação de metionina (15.994915 Da) e acetilação N-terminal (42.010565 Da) para modificações variáveis. A especificidade enzimática foi padronizada para tripsina completa, com no máximo duas clivagens perdidas. O menor tamanho de peptídeo estipulado foi padronizado para 7 aminoácidos.

1.4.13 Extração de RNA e eletroforese de VEs totais

Uma cultura de parasitos mantida por 72 horas foi mantida até atingir a confluência (total de $1,2 \times 10^7$ células) e foram dispensados em microtubos numa concentração final de 1×10^6 células/mL (volume final de 1 mL/microtubo). 1 mM de CaCl_2 foi adicionado a cada amostra, e incubado por 37°C. Os pellets foram descartados numa série de centrifugações (600x g/5 min., 4000x g /30 min [2x]) para eliminar debris celular. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000x g por 90 minutos e o pellet resultante foi processado utilizando colunas do tipo spin (Direct-zol RNA Mini Prep – Zymo Research®). O RNA de trofozoítos induzidos e não-induzidos ao processo de vesiculação ($1,2 \times 10^7$ células), assim como o RNA do material de vesiculação foram submetidos à uma eletroforese com agarose 1.5% em TBE (89 mM Tris-HCl pH 7.8, 89 mM borato, 2 mM EDTA) com 0.5 ug/mL brometo de etídio adicionado ao gel. Utilizou-se para comparação um DNA ladder 500 pb

(ThermoFisher®). Cada amostra de RNA foi diluída com um tampão de agarose (15% ficoll, 0.25% xylene cianol, 0.25% azul de bromofenol). A eletroforese foi processada em 90V/30 min. O gel foi mantido numa solução de brometo de etídio (0.5 ug/mL) por 10 min. e o gel foi processado num transiluminador UV (UVP Bioimaging system EpiChem II™ Darkroom).

1.4.14 Sequenciamento miRNAs, análise transcriptômica e bioinformática

Para o sequenciamento, foi utilizado uma cultura confluenta de parasitos ($1,2 \times 10^7$ células) e processado como tópico anterior para obtenção de VEs totais. O pellet dos VEs foi resuspenso em 350 uL de solução de lise e o RNA foi extraído utilizando colunas do tipo spin (Total RNA Purification Kit – Norgen Biotek®, Canada). O pipeline de análise se iniciou com o sequenciamento Illuminado transcriptoma total das VEs. Depois, a Plataforma Ion Torrent foi usada e o RNA foi analisado com o MirDeep2®. Como referência, foram utilizados os 50 miRNAs descritos em Zhang et al (2009). Os genes-alvos de predição (*Homo sapiens*) dos MiRNAs predominantes foram identificados com o MiRDB (<http://mirdb.org/miRDB>), usando um escore de predição >60 (Wang, 2008). A funcionalidade de alvos foi analisada com a plataforma DAVID Bioinformatics 6.8 (<http://david.ncifcrf.gov>).

1.4.15 Marcação de VEs com corantes fluorescentes

Para estudos de internalização de VEs em células mamíferas, VEs foram marcadas e testadas com éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE, ThermoFisher™) ou o corante lipofílico PKH-26 (SigmaAldrich™). Para marcação com CFSE, 1 µL do corante fluorescente foi diluído com ambas as amostras de VEs em 1 mL PBS (1x). Para marcação com PKH-26, 2 µL do corante foram diluídos em 1 mL do diluente C, e ambas as populações de VEs foram diluídas 1:40 no mesmo diluente. Ambas as diluições foram misturadas num volume de 1:1. Para os dois tipos de corante, a marcação foi continuada num intervalo de 15 minutos, a temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida adicionando 1 mL SFB, as amostras foram lavadas em PBS (1x) e ultracentrifugadas em 15.000xg por 1 hora para obter VELs, e a 100.000xg por 4 horas para coleta de VEPs.

1.4.16 Internalização de VEs do parasite em células mamíferas

Células Caco-2 foram incubadas em lamínulas 13 mm estéreis (ThermoFisher™) a 37°C (5% CO₂) com 7 ou 14 µg de ambos os tipos de VEs produzidos por *G. intestinalis*, num período de 1 hora. Os núcleos das células Caco-2 foram marcados com DAPI (azul, ThermoFisher™). Depois da incubação, as células foram lavadas três vezes em PBS (1x), e fixados com 4% paraformaldeído. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS (1x) e colocadas numa lâmina com 10 µL de uma solução de glicerol a 50%. VEs internalizadas foram detectadas por microscopia confocal (Nikon A1R HD™ Multifoton Confocal). Imagens foram processadas pelo software Image J (v. 1.48 – open source, Schneider et al., 2012). A intensidade de fluorescência de duas imagens por amostra foi obtida num experimento de duplicatas, e a correção de fluorescência celular foi estimada como em McCloy et al (2014).

1.4.17 Ensaio de citotoxicidade com inibidores de VEs em células Caco-2

Células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, e mantidas a 37°C em 5% CO₂ até confluência em RPMI-1640 contendo 10% SFB e 1% penicilina/estreptomicina (1000 UI). As células foram tratadas com 10 µM de albendazole (ABZ, Sigma-Aldrich™, controle positivo), 100 µM Cl-amidina ou 10 µM CBD, num volume final de 100 µL/poço. Albendazole foi solubilizado em dimetilsulfóxido e utilizada para manter a concentração final sob 0.1% variação. Após 48 horas, os poços foram lavados com 100 µL de PBS (1x). Células foram fixadas com metanol absoluto (50 µL) por 10 minutos, seguida da adição de 50 µL de cristal violeta 0.2% em etanol/água (2% v/v). Depois de 2 minutos, os poços foram exaustivamente lavados com 200 µL de PBS (1x). A eluição foi realizada com uma solução de citrato de sódio (0.05 µM, 10 minutos), e absorbância foi determinada a 540 nm utilizando um leitor de espectrofotômetro de placa, conforme descrito em Missina et al (2018).

1.4.18 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos foi realizada com o software GraphPad Prism™ 6 utilizando ANOVA de dois fatores. Os valores foram representados como média ± desvio-padrão das médias, adquiridos em triplicatas biológicas. A normalidade dos dados foram acessados previamente à análise. Valores $P \leq 0.05$ foram definidos como significativos.

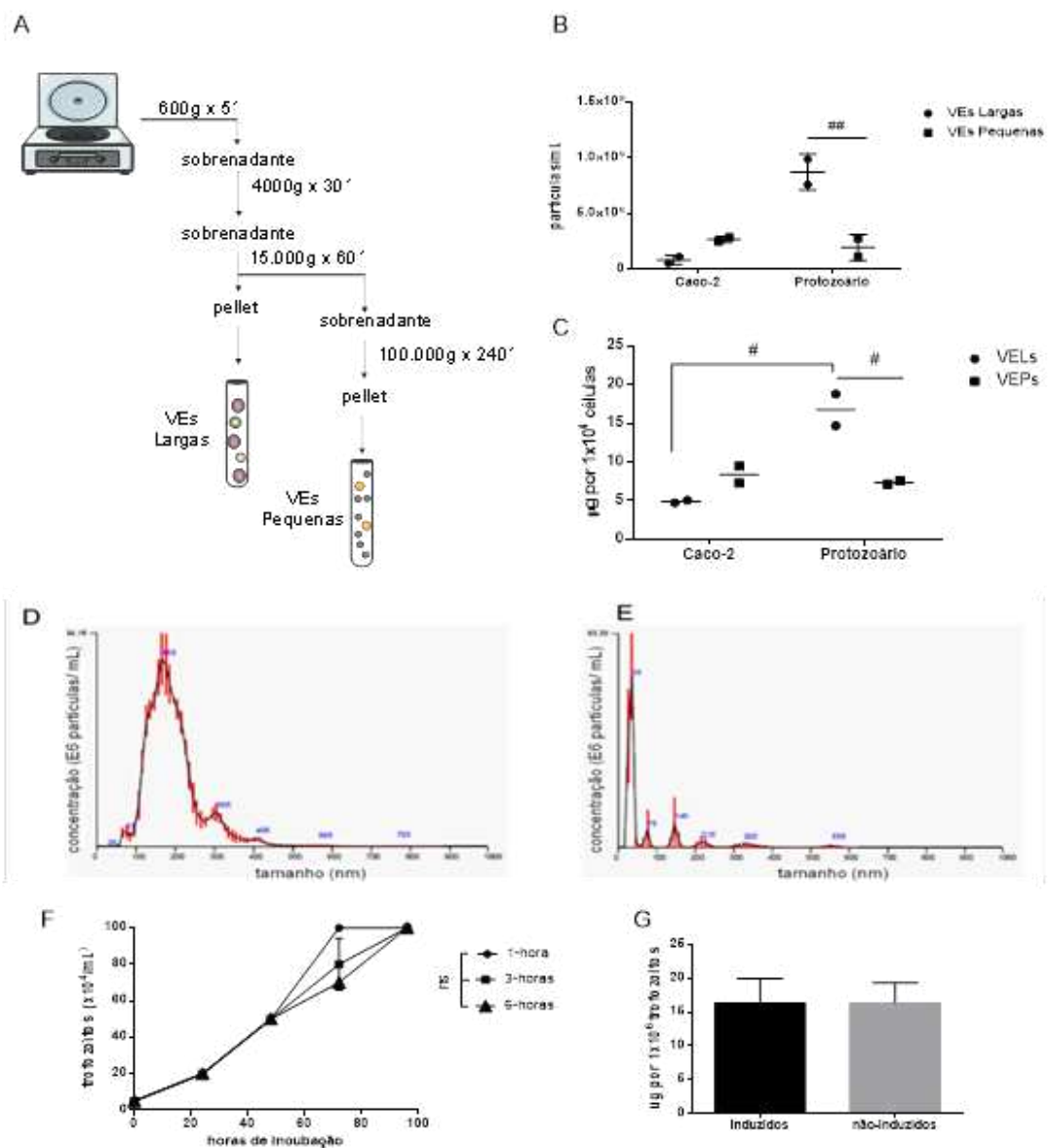
1.5 RESULTADOS

1.5.1 *Giardia intestinalis* é capaz de produzir duas populações distintas de VEs.

Duas diferentes populações foram isoladas do parasito. O protocolo prévio (Evans-Osses et al., 2017) foi modificado (adição de 15.000xg/1hora, aumento do tempo de ultracentrifugação para 4 horas) para separar duas novas populações: vesículas extracelulares largas (VELs) e vesículas extracelulares pequenas (VEPs), a partir do total de EVs descrito anteriormente. O protocolo de obtenção das populações de VEs pode ser observado na Figura 4A. Utilizando este método, VELs foram recuperadas a 15.000xg, e VEPs a 100.000xg. O protocolo foi aplicado para parasitos e células mamíferas relacionadas à adesão do parasito (células Caco-2). A análise de rastreamento de nano-partículas, NTA, demonstrou uma produção maior de VEs produzidas pelo parasito, quando comparado às células Caco-2 (aproximadamente 3x mais), conforme Figura 4B. A maior produção de VEs também foi confirmada pela quantificação proteica por MicroBCA (Figura 4C). O protozoário foi capaz de produzir uma quantidade maior de VELs em comparação às VEPs (aproximadamente 3x mais). As duas populações, VELs e VEPs, apresentaram um diâmetro vesicular médio de 187.6 e 67.7 nm, respectivamente (Figura 4D-E).

Uma avaliação do crescimento de trofozoitos em cultura foi realizado após estimula-los à vesiculação por 1, 3 ou 6 horas, para determinar se a capacidade do parasita de liberar vesículas era constante ou poderia ter um limite, conforme Figura 4F. A curva de crescimento dos parasitos em meio completo foi acompanhada num intervalo de 96 horas (37°C, 5% CO₂), e não se observou diferenças no padrão de multiplicação dos trofozoitos dos diferentes grupos, demonstrando que a atividade de liberação de vesículas não afetou a viabilidade nem o fitness do parasita.. Tampouco foram observadas diferenças no padrão de vesiculação de trofozoitos induzidos e não-induzidos ao processo de encistamento (Figura 4G). Isso indica que, possivelmente, os processos de encistamento e de vesiculação sejam independentes.

Figura 4 – Isolamento e caracterização de duas populações distintas de VEs produzidas por *Giardia intestinalis*. A. Protocolo de isolamento de VELs e VEPs baseado em centrifugação diferencial. B. Quantificação de vesículas extracelulares por NTA. C. Quantificação de vesículas extracelulares por microBCA. D-E. Estimativa do tamanho vesicular por NTA para VELs (D) e VEPs (E). F. Avaliação da curva de crescimento de parasitos após diferentes períodos de vesiculação. G. Produção de VEs de trofozoitos induzidos e não-induzidos ao processo de encistamento. Os dados são representativos de pelo menos três experimentos independentes, representados como desvio-padrão da média. # $P \leq 0.05$; ## $P \leq 0.01$, versus o grupo correspondente, indicado por linha; ns: não-significativo.



Fonte: o autor (2020).

1.5.2 O tratamento com inibidor-PAD e CBD afetam a biogênese de VEs em *Giardia*

Os trofozoitos de *G. intestinalis* foram tratados com Cl-amidina, um inibidor-PAD ou CBD para avaliação da liberação de VEs. Ambos os compostos reduziram significativamente a produção de VEs do parasito (~85% para Cl-amidina e ~75% para CBD, maiores concentrações testadas), conforme Figura 5A. Além disso, foi testada a capacidade dos compostos de impedir adesão de trofozoitos em monocamada intestinal epitelial. A Figura 5B demonstra que os dois tratamentos diminuíram a adesão de trofozoitos à monocamada de células Caco-2 (um aumento de duas vezes mais parasitos no sobrenadante, comparados ao grupo controle).

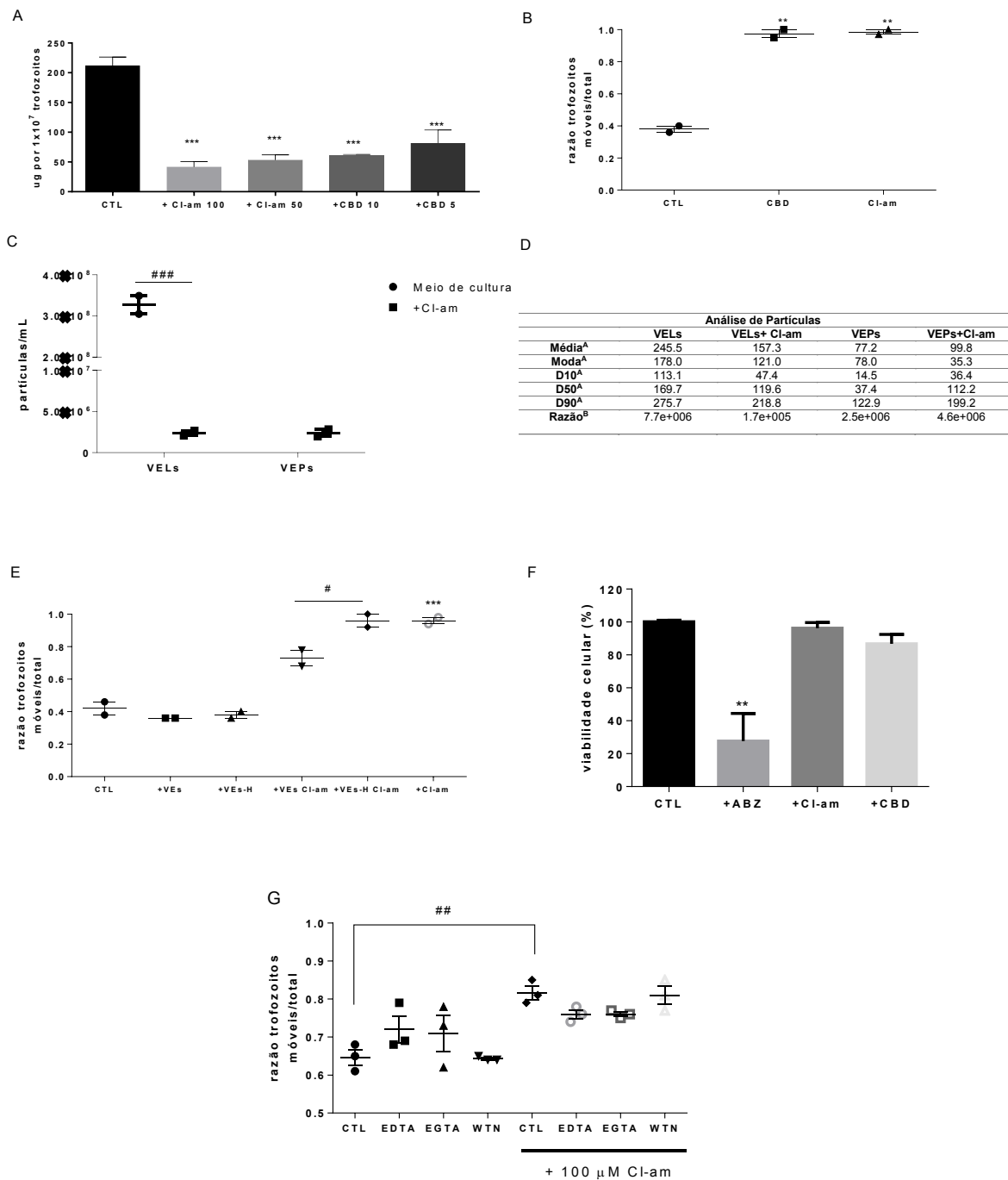
Posteriormente, foi investigado se Cl-amidina afeta a liberação das duas populações distintas, VELs e VEPs de maneira similar. A estimativa da concentração de VELs por NTA sugere uma diferença significativa entre o grupo tratado com o inibidor-PAD, comparado ao grupo não tratado (uma diferença 100 vezes maior), enquanto não se observaram diferenças na liberação de VEPs entre os grupos tratados e não-tratados (Figura 5C). Os valores que descrevem as características de cada população de vesículas estão identificados na Figura 5D. Pode-se observar que o diâmetro vesicular médio (nm) das VELs liberadas na presença de Cl-amidina foram significativamente reduzidas: VELs (245.5), +Cl-am VELs (157.3). Não se observaram diferenças entre VEPs de grupos tratados e não-tratados com Cl-amidina. As VEs totais do parasito foram expostas à inativação por calor antes de utilizá-las para o tratamento das co-culturas. Os grupos de trofozoitos tratados com o inibidor-PAD e VEs obtiveram uma maior adesão (aumento de 20%) à células Caco-2 quando comparadas aos parasitos tratados com Cl-amidina e VEs inativadas pelo calor, conforme figura 5E.

Posterior ao tratamento, investigou-se se o tratamento com os inibidores poderia afetar a viabilidade dos parasitos. Desta forma, realizou-se um teste de toxicidade dos supostos inibidores-PAD e CBD utilizando células Caco-2. Como controle positivo, foi empregado o tratamento com albendazole, uma das drogas mais comuns no tratamento para giardíase. A Figura 5F mostra que os trofozoitos expostos aos inibidores de VEs não apresentaram efeitos citotóxicos num intervalo de 48 horas, diferente do albendazole. Desta forma, sugere-se que a inibição da

produção de VEs ocorre por vias bioquímicas que não interferem no processo de multiplicação e crescimento do parasito.

Os parasitos tratados com os inibidores de VEs por 1 hora no protocolo de vesiculação foram suspendidos em tubos com meio de cultura completo, e não apresentaram nenhuma diferença na curva de crescimento, comparada ao grupo controle. Em seguida, em outro experimento independente, investigou-se a capacidade de adesão dos trofozoitos após tratamento com agentes quelantes (EDTA, um quelante de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, EGTA, um quelante de Ca^{2+}) e wortmanina (inibidor da PI3K), na presença ou não de Cl-amidina, num ensaio de interação parasito-hospedeiro. O ensaio foi realizado para investigar se estes compostos afetam alguma via metabólica necessária para a ação da Cl-amidina. O tratamento com os compostos não afetou a adesão dos trofozoitos, conforme apresentado na Figura 5G. Apenas o controle tratado com Cl-amidina apresentou uma menor adesão de parasitos às células Caco-2.

Figura 5 – Os inibidores de VEs Cl-amidina e CBD diminuem a produção de VEs secretadas por *G. intestinalis*. A. Quantificação de VEs após tratamento com Cl-amidina (Cl-am; 100 ou 50 μM) ou Canabidiol (CBD; 10 ou 5 μM). B. Ensaio parasito-hospedeiro concomitante ao tratamento com inibidor-PAD (100 μM) ou CBD (10 μM). C. Concentração de VEs produzidas pelo protozoário, estimativa por NTA, após tratamento com 100 μM de Cl-am. D. Análise de partículas do parasito (A. estimativa de tamanho das VEs por NTA (nm); B. rendimento (partículas/ μg de proteína) obtidas em 1×10^6 células). E. Ensaio parasito-hospedeiro após tratamento com VEs, VEs inativadas pelo calor (VEs-H), e inibidor-PAD (Cl-am). F. Efeitos citotóxicos dos inibidores de VEs (Cl-am ou CBD) ou albendazole (ABZ) em monocamadas de células Caco-2. G. Efeito da Cl-amidina em ensaio parasito-hospedeiro após tratamento com EDTA (5 mM), EGTA (5 mM) e wortmanina (WTN; 100 nM). Os dados são representativos de pelo menos três experimentos independentes, representados como médio do desvio-padrão médio. ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ comparado ao grupo controle (CTL). # $P < 0.05$, ## $P \leq 0.01$, ### $P \leq 0.001$; versus o grupo correspondente, indicado por linha.



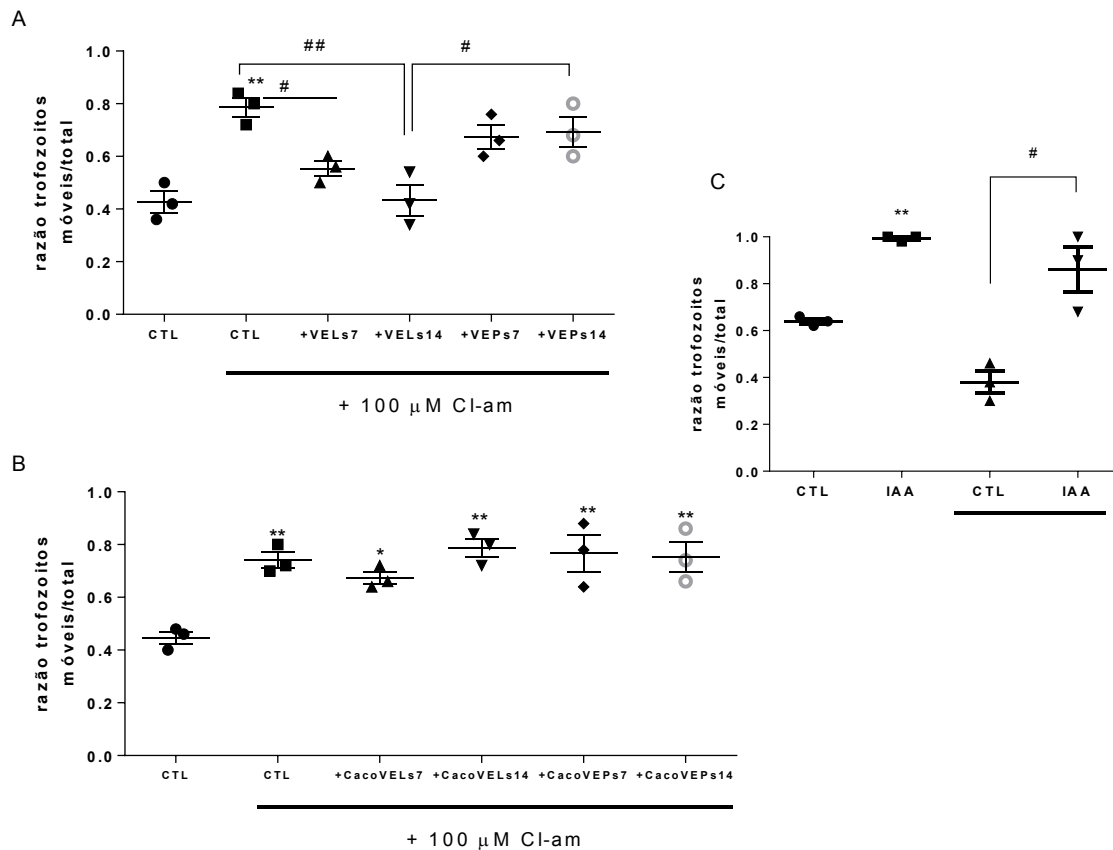
Fonte: O autor (2020).

1.5.3 VELs derivados do parasito, mas não suas VEPs, restoram a adesão de trofozoitos tratados com inibidores de VEs.

Devido à identificação de duas populações distintas de VEs em *G. intestinalis*, verificou-se se as duas subpopulações apresentam o mesmo efeito fenotípico na adesão in vitro do parasito às células do hospedeiro. Para este ensaio, duas concentrações (7 e 14 μg) de ambas as populações foram utilizadas,

correspondendo à quantidade liberada pelo parasito na vesiculação in vitro. As vesículas maiores derivadas do parasito foram capazes de restabelecer a adesão dos parasitos após tratamento com Cl-amidina, num efeito dose-dependente (Figura 6A). Em contraste, nenhum efeito foi observado no tratamento das co-culturas com VEPs. Estes resultados sugerem que propriedades físicas relacionadas à aderência podem ser encontradas na população maior de VEs, e desta forma, uma população em particular de vesículas interfere de maneira seletiva. Posteriormente, investigou-se se VEs derivadas do hospedeiro poderiam contribuir no processo de aderência. Para o ensaio, monocamadas de células Caco-2 foram lavadas e tratadas com Cl-amidina e parasitos foram adicionadas aos poços, seguido de tratamento com VEs derivadas de células Caco-2. A Figura 6B indica que, diferente do efeito decorrente do tratamento com VEs maiores do parasito, as VELs ou VEPs do hospedeiro não demonstraram algum efeito na adesão de trofozoitos. Além disso, investigou-se a influência das cisteína peptidases na adesão de trofozoitos às células Caco-2. Parasitos foram tratados com IAA, um inibidor de cisteína peptidases, e constatou-se que o composto causou uma redução significativa na adesão. Contudo, este efeito foi reduzido quando os parasitos foram tratados com IAA, mas também VELs (Figura 6C). Isso indica que os inibidores de proteases não apresentaram algum papel na adesão dos parasitos, com exceção da cisteína protease, cujo efeito na inibição da adesão já foi descrito (Rodríguez-Fuentes et al., 2006).

Figura 6 – VEs derivadas do parasito estão envolvidas de uma maneira seletiva com a adesão de *Giardia* com as células do hospedeiro. A. Ensaio patógeno-hospedeiro concomitante ao tratamento com distintas populações de VEs e 100 µM Cl-amidina. B. Ensaio patógeno-hospedeiro concomitante ao tratamento com distintas VEs de células Caco-2 e 100 µM Cl-amidina. C. Ensaio patógeno-hospedeiro envolvendo tratamento com um inibidor de protease e VELs. Os dados são representativos de pelo menos três experimentos independentes, representados como médio do desvio-padrão médio. **P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001 comparado ao grupo controle (CTL). #P <0.05, ##P ≤ 0.01, ###P ≤ 0.001; versus o grupo correspondente, indicado por linha.



Fonte: o autor (2020).

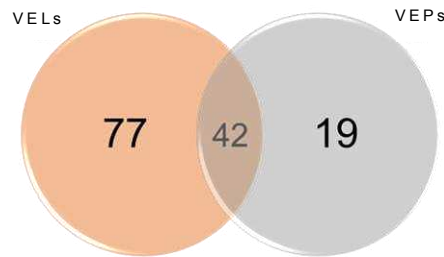
1.5.4 As diferentes populações de VEs contêm perfis de proteínas distintos

A análise proteômica das VELs e VEPs revelou algumas diferenças em seus conteúdos proteicos (Anexo I). Um total de 138 proteínas foram identificadas na fração total de VEs. Destas, 77 foram identificadas exclusivamente nas VELs, enquanto 19 foram específicas de VEPs (Figura 7).

Importantes produtos relacionados ao gênero *Giardia* foram comuns à ambas populações de VEs, como os Antígenos Variáveis de Superfície (AVS), giardinas, cathepsina B, e outros fatores de virulência (arginina deiminase, ornitina carbamoyltransferase).

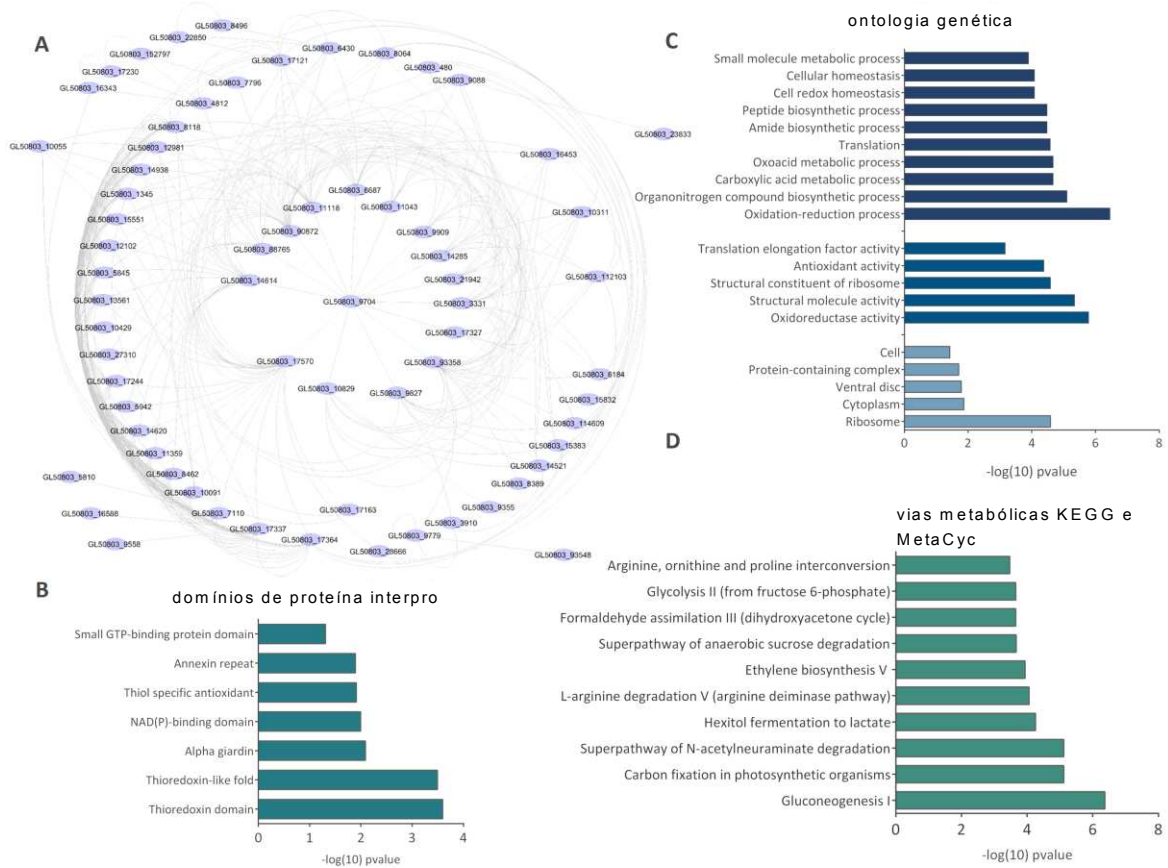
Muitas proteínas encontradas nas VELs estavam relacionadas à composição do citoesqueleto e ligação proteica. De acordo com a Tabela 1, outros produtos estão associados ao estresse oxidativo, como Peroxirredoxina-1. VEPs contêm proteínas relacionadas ao metabolismo ribossômico. Uma análise bioinformática do proteoma sugere que as vesículas tem um enriquecimento de produtos enzimáticos, relacionados à processos metabólicos, e estresse oxidativo (Figura 8).

Figura 7 – Os subtipos de VEs de *Giardia intestinalis* diferem no cargo proteico.



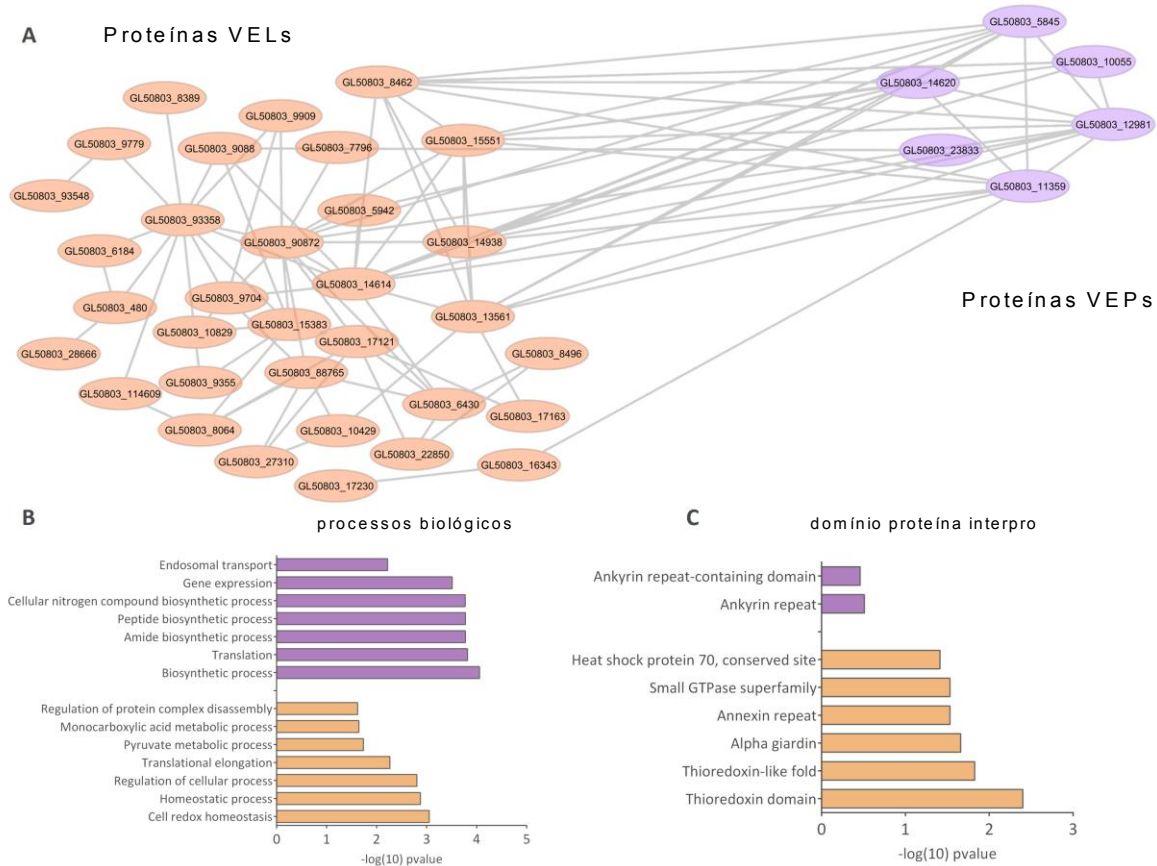
Fonte: O autor (2020).

Figura 8 – Análise bioinformática das proteínas de VELs e VEPs. A. rede de interação proteína-proteína. B. Domínios (Pfam) identificados no conteúdo vesicular. C. Ontologia genética das VEs. D. Vias metabólicas das VEs.



Fonte: O autor (2020).

Figura 9 – Análise bioinformática do conteúdo proteico das VEs. A. Interações proteína-proteína entre os produtos exclusivos de VELs e VEPs. B-C. processos biológicos e domínios Pfam, respectivamente.



Fonte: O autor (2020).

As proteínas identificadas nos dois perfis de VEs revela uma diferença na sub-localização celular: VELs apresentam produtos do citoplasma, núcleo e membrana plasmática, enquanto as proteínas das VEPs possuem uma localização predominante no citoplasma. Interações proteína-proteína e ontologia gênica das vesículas sugere diferentes processos biológicos e estruturas de domínio, conforme indica a Figura 9.

Tabela 1 – Conteúdo proteômico associado às VELs e VEPs.

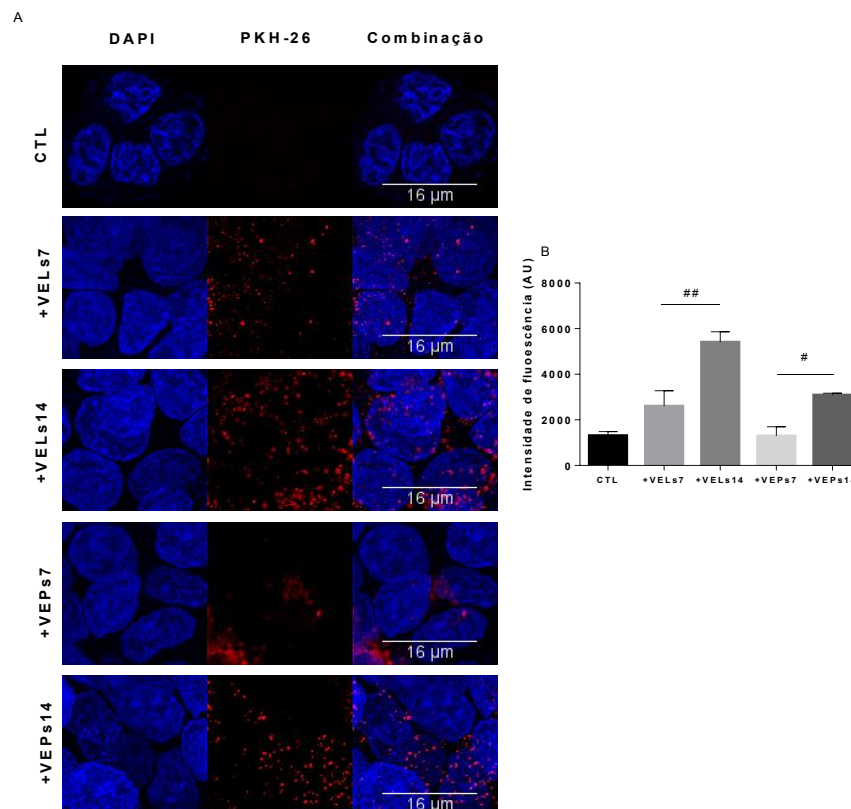
ASSOCIADO AO CITOQUESQUELETO	
Produto	Descrição
GL50803_17090	Domínio SAM
GL50803_86676	Giardina delta
GL50803_17230	Giardina gamma
GL50803_14551	Giardia-alfa-6
GL50803_11654	Giardina-alfa-1
GL50803_7796	Giardina-alfa-2
GL50803_15410	Proteína quinase
GL50803_11390	NEK quinase
GL50803_15409	NEK quinase
GL50803_8389	Katanina p60
GL50803_102101	Quinesina-3
GL50803_12139	Ankyrina (Proteína 21.1)
GL50803_14859	Ankyrina (Proteína 21.1)
GL50803_17551	Ankyrina (Proteína 21.1)
GL50803_7021	Ankyrina (Proteína 21.1)
GL50803_16263	DIP13
GL50803_7520	Proteína hipotética
GL50803_16343	Proteína do corpo mediano
GL50803_13584	Proteína hipotética
RESPOSTA DE ESTRESSE-OXIDATIVO	
Produto	Descrição
GL50803_5810	Proteína com domínio PNPOx
GL50803_13864	HSP 90-alfa
GL50803_9355	Proteína com domínio tioredoxina
GL50803_15383	Peroxiredoxina-1
GL50803_27310	Proteína ligada ao estresse-fosforecente 1
GL50803_6289	Proteína fixW
GL50803_86676	Giardina delta
GL50803_88765	HSP 70
GL50803_114609	Piruvato ferredoxina oxidoreductase
GL50803_8064	Dissulfito isomerase

Fonte: O autor (2020).

1.5.5 As duas populações de VEs são internalizadas por células mamíferas.

As vesículas derivadas de *Giardia* foram analisadas quanto à sua capacidade de interagir com as células do hospedeiro. Dentre os fluorocromos testados para marcação das VEs, apenas PKH-26 demonstrou uma marcação homogênea. Ambas as populações marcadas com o corante foram incubadas com monocamadas de células Caco-2 por 1 hora, em duas concentrações. A microscopia confocal revela padrões pontuados de fluorescência, distribuídos intracelularmente nas células Caco-2 (Figura 10A). Ambas as populações foram captadas pelas células do hospedeiro em uma maneira dose-dependente. Apesar da maior internalização das VELs ser maior, conforme se constata pela intensidade de fluorescência (Figura 10B), é possível que isto esteja relacionado ao seu maior tamanho. O destino intracelular das VEs não foi determinado.

Figura 10 – As duas subpopulações de VEs do protozoário são internalizadas por células Caco-2. A. Células Caco-2 incubadas com VELs ou VEPs marcadas com PKH26. B. Quantificação de internalização de VEs por intensidade de fluorescência; barra de escala a 16 μm . Os dados são representados por três experimentos independentes, como média do desvio-padrão. # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$; versus o grupo correspondente, indicado por linha.

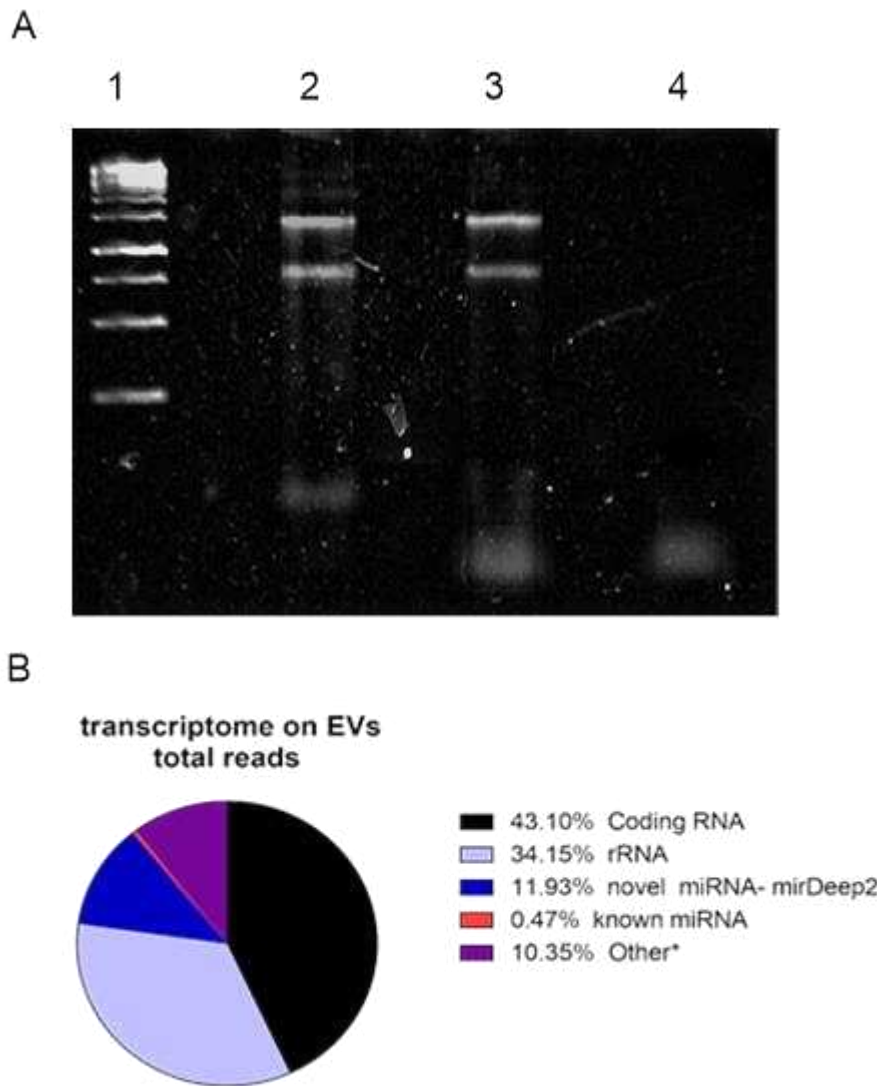


Fonte: O autor (2020).

1.5.6 A análise bioinformática e sequenciamento sugerem a presença de pequenos RNAs nas VEs do parasito

A presença de RNAs foi investigada pela extração de RNA e eletroforese em Gel de agarose das VEs totais, assim como o sequenciamento do conteúdo extraído pela Plataforma Ion Torrent. Os RNAs presentes foram analisados pelo software MirDeep2®. A análise de RNA por eletroforese demonstra a presença de pequenos RNAs em trofozoítos induzidos e não-induzidos à produção de VEs (Figura 11A). Em adição, pequenos RNAs foram detectados em VEs totais, migrando numa posição similar aqueles observados em trofozoitos. Considerando as sequencias de RNA previamente descritas para *G. intestinalis*, RNAs codificantes foram o tipo mais abundante (Figura 11B), representando 43.1% do total de leituras de RNA presentes em VEs. O produto codificante para Proteína 21.1 foi o transcrito mais prevalente, um produto ainda sem descrição funcional, seguido High Cyst Membrane Group 2. As sequencias identificadas pelo mirDeep2® como miRNAs novos (22 candidatos) foram mais abundantes do que miRNAs descritos. A predição de alvo dos miRNAs revela genes envolvidos na sinalização múltipla de processos bioquímicos como serina/treonina quinases. Em adição, a pesquisa ontogenética com o software DAVID Bioinformatics sugere o envolvimento de genes relacionados à proliferação, diferenciação celular e inflamação epitelial, como vias MAPK-quinases (Proteínas quinases ativadas por mitógenos, MAPK26, MAPK8).

Figura 11 – Extração de RNA e análise bioinformática sugerem a presença de pequenos RNAs nas VEs totais do parasito. A. Eletroforese em agarose 1.5%. 1. DNA ladder 500 bp. 2. RNA extraído de trofozoítos não-induzidos à produção de VEs. 3. RNA extraído de trofozoitos induzidos à produção de VEs com 1 mM CaCl₂. 4. RNA extraído de VEs totais purificadas. B. Relação dos diferentes transcritos obtidos das VEs totais de *G. intestinalis*.



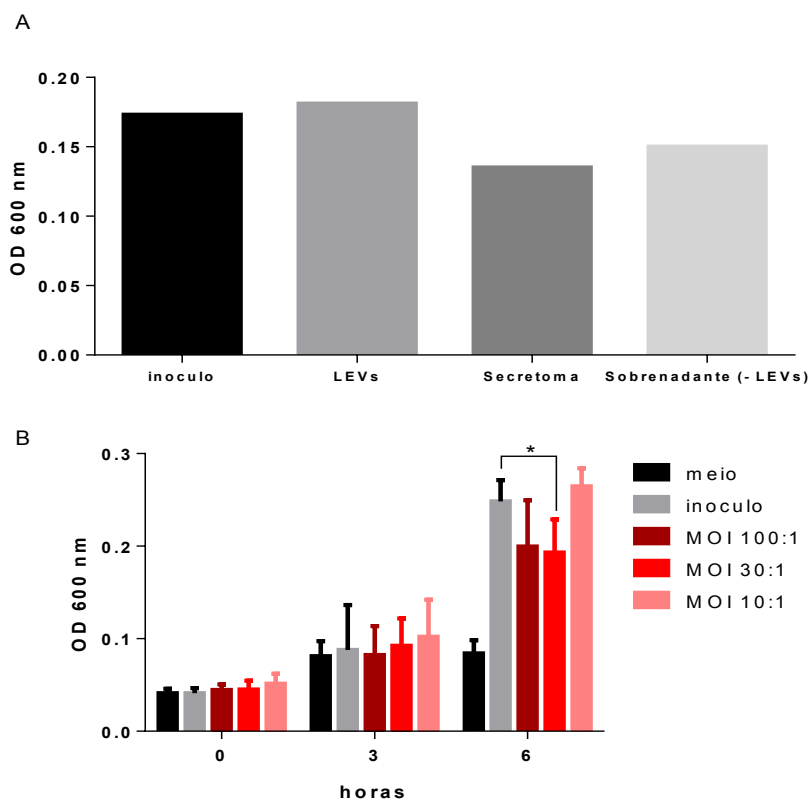
Fonte: O autor (2020).

Após a investigação do conteúdo proteico e de ácidos nucleicos das VEs, analisou-se o impacto da presença do parasito no intestino. Supõe-se que as VEs apresentem fatores para a persistência do protozoário no intestino, ou algum componente que o favoreça na relação com o hospedeiro/microbiota intestinal. Por estas razões, realizaram-se testes in vitro de inibição do crescimento de bactérias após a inubcação com parasitos e/ou VEs.

1.5.7 Investigação do efeito microbicida de parasitos ou seus produtos *in vitro*.

Estudou-se a capacidade de parasitos ou seus produtos (secretoma, VELs ou sobrenadante de culturas livres de VEs) inibirem o crescimento *in vitro* de *E. coli* em microplacas. A Figura 12 indica o resultado do ensaio de incubação de VELs de *Giardia intestinalis*, ou seu produtos secretórios-excretórios em cultura bacteriana. Não houve efeito bactericida significativo envolvendo VELs ou seu sobrenadante livre de VEs (Figura 12A). A Figura 12B apresenta a investigação do efeito microbicida através do contato direto com trofozoítos de *G. intestinalis*. Nota-se que em 6 horas houve uma inibição significativa da proliferação bacteriana com uma relação de bactéria/protozoário de 30:1.

Figura 12 - Ensaio de microbicidade envolvendo trofozoítos de *G. intestinalis* e seus produtos. A. Co-incubação de VELs ou produtos excretórios-secretórios com inoculo bacteriano. B. Co-incubação de trofozoítos em diferentes concentrações com inoculo bacteriano, em diferentes intervalos de tempo. * $P \leq 0.05$.



Fonte: O autor (2020).

1.6 DISCUSSÃO

1.6.1 As diferentes populações de VEs apresentam diferentes conteúdos e efeitos fenotípicos

O campo de pesquisa de VEs cresce rapidamente, e a caracterização das funções de subpopulações ganha atenção (Tckach et al, 2018). A complexa função das VELs revelada neste estudo em *Giardia* sugere que sua influência no fenótipo poderia ser ainda mais diversa do que as VEPs. Nenhum biomarcador foi considerado no estudo, devido à ambas as populações de VEs serem enriquecidas com misturas de vesículas, compondo populações de caráter heterogêneo. Diferentes linhagens de células, como as de parasitos, podem conter diferentes padrões de marcadores em seu genoma (Kalra et al., 2013; Vader et al., 2016; Gonçalves et al., 2018; Ramirez et al., 2018).

Propriedades relacionadas às diferentes funções de VELs já foram estudadas em modelos não-infecciosos. Por exemplo, VELs derivadas de células de câncer de próstata contém mais DNAs de fita dupla do que as VEPs (Vagner et al., 2018). VELs (microvesículas) derivadas de plaquetas também foram associadas com o aumento da adesão de leucócitos polimorfonucleares (Fujimi et al., 2002). Por outro lado, VEPs foram associadas à fenótipos de maior adesão em duas linhagens de células cancerosas (Jimenez et al., 2019). Para outro modelo parasitário, *Fasciola hepatica*, constatou-se que as VELs contém produtos associados à digestão (cathepsina 1), enquanto suas VEPs possuem componentes estruturais de membrana e fatores imunomodulatórios (Cwiklinski et al., 2015).

VEs de *Giardia* já foram previamente estudadas nas interações parasito-hospedeiro. Evans-Osses et al (2017) identificaram que microvesículas aumentam a adesão in vitro de trofozoitos em células Caco-2, e aumentam a ativação de células dendríticas imaturas. Em 2019, Moyano e colaboradores caracterizaram uma população de exossomos, e sugeriram que sua liberação é dependente de ceramida e Rab11, apesar da perda evolutiva do ESCRT pelo parasito. De acordo com Saha et al (2018), o ESCRT do parasito está nas PV, o equivalente endolisossomal para *Giardia*. Wampfler et al (2014) conduziram uma análise proteômica do conteúdo das vesículas constituintes do citoplasma do parasito, as PV e as ESV. As últimas aparentam assumir um papel similar ao retículo endoplasmático, como o recrutamento de ribossomos às membranas de organelas. Em 2004, Benchimol e

colaboradores estudaram a liberação das VEEs na superfície do protozoário. Detectaram grânulos que desembocam na membrana plasmática. Em adição, Midlej et al (2019) investigaram a liberação de vesículas intraluminais de trofozoitos tratados com CaCl_2 . Utilizando técnicas de microscopia eletrônica, demonstraram a exocitose destas vesículas, e sua recuperação no sobrenadante. Finalmente, uma análise proteômica de produtos excretórios-secretórios (PES) foi conduzida, incluindo VEs de culturas axênicas e parasitos interagindo com células mamíferas. Foram identificadas proteínas relacionadas ao metabolismo, e produtos localizados em VEs não continham peptídeos-sinais (Ma'ayeh et al 2017).

Nossa análise proteômica das VEs detectou fatores de virulência relevantes, como cathepsina B, e moléculas imunogênicas, como as AVS. Muitos produtos estavam associados ao citoesqueleto do parasito, como giardinas, katanina e proteínas com padrões de ankyrina. Devido ao papel proeminente das proteínas do citoesqueleto na adesão do parasito, propomos que a adesão de *Giardia* às células epiteliais poderia ter relação com as moléculas de superfície das vesículas, e também as proteínas associadas ao disco identificadas nas VELs. Estas proteínas são ricas em repetições de ankyrina, e podem contribuir para adesão, interações proteína-proteína, e estabilidade (Weiland et al., 2005; Andersson et al., 2007; Nosala et al., 2018; Hagen et al., 2020). Algumas das giardinas detectadas nas VELs, como a alfa-1-giardina, são capazes de se ligar à glicosaminoglicanos presentes no epitélio intestinal, e desempenhar um papel na interação parasito-hospedeiro (Weiland et al., 2003).

Giardia, mesmo desprovida de uma mitocôndria típica, e de enzimas antioxidantes convencionais (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase), deve sobreviver num ambiente hostil no intestino delgado. Nossa análise proteômica também sugere que VEs carregam produtos associados à atividade oxidoreductase, como Peroxiredoxina-1, FixW e PFOR. Estes produtos foram também identificados no trabalho de Ansell et al (2016). Ma'ayeh et al (2015) investigaram o transcriptoma de isolados de *Giardia* no estresse oxidativo. Os isolados GS revelaram maiores níveis de Peroxiredoxina-1, e outros produtos antioxidativos. Em outro trabalho do mesmo autor (Ma'ayeh et al., 2017), uma análise proteômica dos trofozoitos incubados com células epiteliais intestinais detectou 11 produtos com atividade oxidoreductase no isolado WB.

Uma análise transcriptômica sugere a presença de pequenos RNAs nas VEs, e algum tipo de silenciamento gênico poderia ocorrer no hospedeiro. A investigação utilizando o software MirDeep2® propõe que determinados produtos detectados sejam miRNAs, e poderiam ter algum papel na resposta inflamatória de células epiteliais. A fosforilação MAPK por ativação de Toll-like receptors do tipo 2 (TLR2), induz a produção de interleucina 6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) em camundongos (Li et al., 2008). Os miRNAs podem inibir cascatas de sinalização após a internalização de VEs pelo hospedeiro, através de MAPKs. Estas moléculas apresentam um papel relevante na resposta pro-inflamatória de células epiteliais, incluindo quinases de sinalização extracelular (ERK), p38 e quinases N-terminais (JNK) (Gao et al., 2018). A modulação de genes das vias MAPK por miRNA presentes em VEs já foram reportadas em *Echinococcus* (Macchiaroli et al., 2017). É possível que miRNAs contidos em VEs possam silenciar genes envolvidos na resposta imune intestinal, permitindo o curso clínico de baixa inflamação da giardíase.

Os ensaios de co-incubação de VELs do protozoário com bactérias não indicaram algum efeito microbicida. Em relação ao secretoma era esperada alguma inibição bacteriana *in vitro*, conforme já observado por Manko et al (2017). No entanto, esperava-se que as vesículas extracelulares purificadas tivessem algum efeito semelhante na microbicidade. Supõe-se que VEs representam um fator de interação com as bactérias tão importante quanto os produtos secretórios-excretórios do protozoário. Portanto, mais replicatas biológicas e testes independentes são necessários para que se possa sugerir alguma interação inibitória de protozoários e seus produtos em bactérias.

O estudo de co-incubação de protozoários e bactérias, em diferentes concentrações exibiu efeitos distintos. A concentração intermediária (relação de 30 bactérias para 1 trofozoito) mostrou-se inibitória. No entanto, é possível que o inoculo mais concentrado, onde a densidade celular é grande, tenha apresentado algum efeito microbicida, porém com uma solução saturada resultou em falso-negativos. Mais experimentos, com diferentes variáveis e condições, serão necessários para continuar a investigar a interação de *G. intestinalis* com bactérias presentes na microbiota intestinal.

1.6.2 As vesículas extracelulares do parasito são inibidas por inibidores das peptidilarginina deiminases

O presente estudo descreve duas populações distintas de vesículas extracelulares produzidas por *Giardia intestinalis*, em que as maiores (VELs), mas não as menores (VEPs) estão associadas à adesão dos parasitos nas células do hospedeiro. Um papel para uma das populações de VEs também foi demonstrado, quando o tratamento de trofozoitos com componentes farmacológicos inibiu seletivamente a biogênese das VELs. O inibidor-PAD Cl-amidina já foi previamente associada como um potente inibidor da liberação de VEs em mamíferos (incluindo linhagens tumorigênicas), assim como nos procariontes (Kosgodage et al., 2017; Kosgodage et al., 2018a; Kosgodage et al., 2019a; Uysal-Onganer et al., 2020). Estratégias de modulação da liberação de VEs já foram elencadas como medidas relevantes nas doenças (Jorfi et al., 2015; Lange et al., 2017; Catalano M, O'Driscoll, 2020; Uysal-Onganer et al., 2020).

Canabinoides já foram previamente relacionados à inibição de invasão de parasitos e imunossupressão da tripanossomíase (Nok et al., 1994; Croxford et al., 2005), assim como efetivos anti-helmínticos (Roulette et al., 2016), mas seus efeitos em *Giardia* ainda não haviam sido investigados. As funções modulatórias de VEs por CBD foram recentemente identificadas, apresentando um papel maior nas inibições de VEs de algumas linhagens celulares do que Cl-amidina (Kosgodage et al., 2018b). Ainda, CBD também foi associado à redução de liberação de VEs por bactérias, modificação de conteúdo proteômico de VEs, e sensibilização de determinadas espécies de bactérias à terapia antimicrobiana (Kosgodage et al., 2019c), indicando uma função filogenética conservada para a modulação de VEs.

Nossa evidência de internalização dose-dependente das vesículas pela célula hospedeira, junto com os dados de proteômica, sugerem que VEs podem ter um papel na recuperação da adesão dos trofozoitos tratados com inibidores-PAD. Experimentos com superexpressão de genes em trofozoitos para liberação por vesículas, e bloqueio de seus produtos com anticorpos monoclonais poderia esclarecer se a interação é específica, e avaliar algum efeito funcional decorrente do cargo das VEs. Entender a internalização e o destino intracelular das VEs, especificamente de suas subpopulações, é uma demanda para estudos no futuro.

Enquanto a maioria dos infectados por *Giardia* são assintomáticos, a giardíase é um fator que contribui à má-nutrição, e aos problemas de crescimento

em crianças de países em desenvolvimento (Fink & Singer, 2017). Ainda, a doença pode perdurar por longos períodos sob a forma crônica. Desta forma, é importante identificar e estudar novas estratégias de tratamento. O inibidor-PAD Cl-amidina e CBD demonstraram uma inibição da liberação de VEs pelo parasito, que contribuem para a aderência ao hospedeiro. Estes compostos despontam como novos candidatos terapêuticos para casos de giardíase crônica.

1.7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que as duas populações de VEs identificadas em *G. intestinalis* até o momento, VELs e VEPs, possuem conteúdos proteicos e funções distintas no fenótipo do patógeno, e são seletivamente moduladas pelo tratamento de Cl-amidina e CBD (Figura 13). Como a adesão ao epitélio intestinal é fundamental à sobrevivência do parasito, e VELs apresentam um papel claro neste processo, o uso de inibidores de VEs podem seletivamente interferir no processo de secreção, representando novas estratégias de tratamento para giardíase.

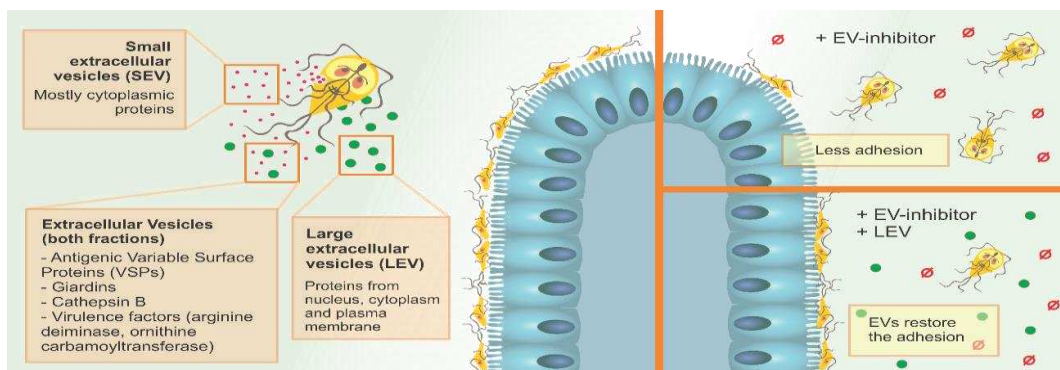


Figura 13 – As vesículas extracelulares de *Giardia intestinalis* possuem diferente conteúdo proteico, e estão envolvidas de forma distinta na recuperação da adesão dos parasitos após tratamento com inibidores de VEs.

Fonte: O autor (2020).

CAPÍTULO II - Drogas antiparasitárias e mecanismos de resistência a drogas associadas a vesículas extracelulares

2.1 INTRODUÇÃO

Giardia intestinalis é responsável por uma das infecções orofecais mais prevalentes do mundo. O patógeno, através de uma estrutura exclusiva do gênero, o disco ventral, adere-se ao epitélio intestinal por uma força de sucção. A adesão é realizada não apenas pelo disco ventral, mas pelas forças propulsivas dos flagelos (Zimorski et al., 2019). Para sobreviver ao intestino delgado, o protozoário precisa atenuar a maquinaria oxidativa do ambiente intestinal, como a produção de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, possui enzimas antioxidantes, como NADH oxidases, e piruvato ferredoxina oxidoreductase (Mastronicola, 2016; Ma'ayeh et al., 2015). O parasito também conta com os produtos secretórios-excretórios para sobreviver ao adverso ambiente intestinal, e à produção de vesículas extracelulares para interação com o hospedeiro (Ma'ayeh et al., 2017; Evans-Osses et al., 2017).

A manifestação clínica da doença é diversa, e depende de vários fatores do hospedeiro, como estado imune e condições nutricionais (Cernikova et al., 2018). A maioria dos casos são assintomáticos, porém, a doença possui uma tendência à cronicidade, o que leva à desnutrição e atrasos no desenvolvimento de crianças (Codrean et al., 2020). Como não há vacinas disponíveis contra o patógeno, os esforços de tratamento são concentrados em estratégias terapêuticas.

As opções modernas de tratamento para a giardíase envolvem vários grupos químicos, como os compostos 5-nitroheterocíclicos (metronidazole e nitazoxanida) e benzimidazoles (albendazole e mebendazole). Apesar do protozoário apresentar uma biologia celular simples, e da disponibilidade de vários compostos terapêuticos, a resistência a droga já foi descrita para os produtos giardicidas envolvidos em estudos in vitro e in vivo (Arguello-García et al., 2020), e muitos genes e mecanismos moleculares estão associados com estirpes de fenótipo resistente a drogas (Muller et al., 2019). Não há um entendimento claro se o patógeno desenvolve resistência ao tratamento de maneira constitutiva, porque plasticidade e reversão fenotípica já foram relatadas (Arguello-Carcía et al., 2009). Acredita-se que dentre os múltiplos mecanismos de resistência a drogas, a eliminação de drogas através de vesículas extracelulares seja uma relevante estratégia de diferentes

linhagens celulares para sobrevivência (Ifergan et al., 2005; Goler-Baron et al., 2011). Estudos envolvendo eliminação de drogas por linhagens resistentes já foram realizadas em câncer e doenças degenerativas (Xavier et al., 2020).

Considerando o número de infecções atribuídos ao patógeno, a falha terapêutica envolvendo os diversos grupos químicos, e efeitos tóxicos relatados para os produtos comerciais disponíveis (Carter et al., 2018), há um interesse pertinente em estudar as diferentes formas em que o parasito se torna refratário ao tratamento, e novas moléculas giardicidas.

Dentre novos candidatos a atividades biológicas contra patógenos, os decavanadatos $[\text{HnV}_{10}\text{O}_{28}](6-n)-$ (V_{10}) estão atraindo interesse como precursores em potencial contra um número de maládas. Alguns esforços foram realizados nos últimos anos para se compreender de que forma o tratamento com V_{10} afeta estruturas lipídicas, proteínas de membrana e alvos em micro-organismos (Aureliano et al., 2014; Kioseoglou et al., 2015; Trevino et al., 2016). Estudos toxicológicos com este agregado polimetálico aumentaram a partir de 2005, e foram revisados por Aureliano e colaboradores (2016).

Apesar do potencial bactericida (Chen et al., 2006; Shahid et al., 2014; Toumi et al., 2015), parasiticida (Turner et al., 2012) e antiviral (Bougie et al., 2006) associado ao V_{10} , atividades farmacológicas envolvendo seu potencial anti-proliferativo continuam escassos, quando comparados aos efeitos anti-tumorais. O presente estudo investiga os efeitos antiproliferativos ou citotóxicos de V_{10} associados à íons orgênicos em culturas de *G. intestinalis*. Decavanadatos foram sintetizados na presença de nicotinamida (3-piridinacarboxamida), uma das formas hidrossolúveis da vitamina B3, e de seu isômero isonicotinamida (4-piridinacarboxamida), produzindo os compostos I e II, respectivamente. Testou-se também as propriedades do decavanadato de sódio $[\{\text{Na}_6(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 4\text{H}_2\text{O}\}]_n$, o composto NaV_{10} . Além disso, investigou-se se o tratamento de trofozoitos com uma das drogas de escolha, o albendazole, é capaz de aumentar a produção de vesículas extracelulares, e se o protozoário é capaz de eliminar a droga na sua forma ativa através das diferentes populações de VEs

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

- Investigação in vitro de atividade biológica de compostos derivados do decavanadato em trofozoítos de *Giardia intestinalis*

2.2.2 Objetivos específicos

- Síntese e caracterização química dos derivados de decavanadatos.
- Ensaio in vitro da inibição do crescimento de trofozoitos tratados com os decavanadatos.
- Ensaio in vitro de aderência de trofozoítos em tubos de poliestireno incubados com os decavanadatos.
- Investigação dos efeitos dos decavanadatos em co-cultura (parasitos e células eucarióticas).
- Análise da citotoxicidade dos decavanadatos em células Vero.
- Investigação da citotoxicidade de VEs derivadas de parasitos tratados com albendazole em trofozoitos.
- Caracterização da produção de VEs de parasitos tratados com albendazole.

2.3 REVISÃO DE LITERATURA

2.3.1 Terapia contra *Giardia intestinalis*

Apesar de medidas sanitárias adotadas contra a giardíase, a estratégia contra o protozoário reside predominantemente na quimioterapia (Arguello-García et al., 2020). Dois grupos químicos principais despontam como as escolhas-padrão para o tratamento: os derivados de nitroimidazoles, e aqueles derivados dos benzimidazoles.

A família dos nitroimidazoles, grupo químico mais utilizado contra o parasito, é composta por várias moléculas, como metronidazole, secnidazole e tinidazole, com mecanismos de ação e alvos que variam entre os compostos. (Leitsch, 2015). O metronidazole é a droga mais utilizada no mundo contra a parasitose, age pela ligação à grupos tióis, culminando num severo estresse oxidativo (Upcroft & Upcroft, 1998). A Nitazoxanida outra representante do grupo, precisa ser reduzida à grupos nitro para ser ativa. Seu modo de ação inclui a inibição da enzima PFOR, que compromete a integridade celular (Hoffman et al., 2007).

Os derivados dos benzimidazoles são também compostos relevantes no tratamento, principalmente representados pelo albendazole. A molécula não apenas é eficaz contra o parasito, mas apresenta efeitos citotóxicos para uma variedade de parasitos. Apresenta um metabolismo hepático mediado por citocromos e enzimas dependentes de flavina. Seu mecanismo de ação consiste na ligação seletiva à β -tubulina, prevenindo a polimerização do citoesqueleto. É responsável também pela disjunção do DNA de fita dupla dos trofozoitos (Martinez-Espinosa et al., 2015).

Nash (2001) sugere que todas as opções farmacológicas já apresentaram falha terapêutica, e assume-se que algumas causas influenciem a situação: re-infecções, imunossupressão, subdosagem e resistência às drogas (Ialle & Hanevik, 2018). Estudos clínicos utilizando metronidazole identificaram índices de resistência em até 20% dos casos (Munoz Gutierrez et al., 2013). Além disso, existem relatos de falha terapêutica envolvendo um componente (albendazole) ou associação de produtos (albendazole e metronidazole), confirmando a indução in vitro do parasito em tornar-se resistente ao contato contínuo com os compostos (Abboud et al., 2001; Brasseur & Favennec, 1995).

Nas últimas décadas, ferramentas modernas para a descoberta de compostos contra o parasito sugerem investimentos para a pesquisa de novas

aplicações de fármacos. Além disso, milhares de moléculas sintéticas cadastradas no DrugBank foram utilizadas em pesquisas *in vitro*, e alguns apresentaram alvos contra o parasito (Sateriale et al., 2014).

2.3.2 Decavanadatos: atividades biológicas

O vanádio é um elemento químico ubíquo na superfície terrestre. Seu consumo é realizado por plantas, animais e humanos, participando do crescimento de processos metabólicos (Rehder, 2020). A maior parte dos compostos produzidos com vanádios para aplicação na ciência medicinal utilizam vanádio conjugado a moléculas orgânicas (Levina & Lay, 2017). Alguns compostos ligados à Vanádio foram utilizados contra patogênicos, como *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium tuberculosis* (Rehder, 2020).

O decavanadato está associado às aplicações em catálise (Li et al., 2018), cristalização proteica (Zebish et al., 2014) e ciências materiais (Cao et al., 2018). Muitas estruturas cristalinas de decavanadatos inorgânico simples e de V_{10} associados a cátions orgânicos foram reportadas (Bosnjakovic-Pavlovic et al., 2011). Estes estudos elucidaram as possíveis interações de V_{10} com alvos biológicos, porém, apenas recentemente iniciaram-se estudos farmacológicos envolvendo a atividade biológica de decavanadatos. Como exemplo, pode-se citar o uso de V_{10} com betaínas como acetato de trimetilamina e trigonelina na inibição da proliferação de tumores mamários e células de adenocarcinoma pulmonar (Kioseoglou et al., 2013). Decavanadato com carnitina demonstrou ser 6-10 vezes mais potente do que ortovanadato e decavanadato com íons orgânicos simples no tratamento tumoral de humanos e camundongos (Galani et al., 2012).

Finalmente, estudos envolvendo modelos animais de diabetes do tipo I e II demonstraram que a associação de metformina com V_{10} induziu maiores respostas glicêmicas e lipidêmicas, diminuindo toxicidade e aumentando a produção de insulina (Treviño et al., 2016). Se os efeitos são causados diretamente pelo V_{10} ou por vanadatos menores gerados no curso dos experimentos, é uma pergunta que deve ser investigada (Aureliano et al., 2016), no entanto, o uso de sais de V_{10} com compostos orgânicos aprimorou muitas respostas de modelos biológicos, e deve ser mais pesquisada.

Resultados promissores foram obtidos com V_{10} ligado à quitosana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Chen et al., 2006). O aumento da

toxicidade foi realizado pela combinação da atividade microbicida da quitosana, e da capacidade do V_{10} de inibir canais iônicos, causando um severo distúrbio metabólico e alterações na membrana. Em relação à estudos com protozoários, $(NH_4)_6(V_{10}O_{28}) \cdot 5H_2O$ demonstrou toxicidade in vitro contra promastigotas de *Leishmania tarentolae* (Turner et al., 2012). A redução da viabilidade celular em 50% foi atribuída ao aumento dos níveis intracelulares do radical superóxido.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Isolados de *Giardia intestinalis* e culturas

Trofozoitos de *G. intestinalis* do isolado WB, clone C6 (ATCC 50803), foram mantidos em meio TYI-S-33 suplementado com 10 % SAB (Ciprion™), 1% penicilina/estreptomicina (1000 UI, Gibco™) e 0.05% bile bovina (ThermoFisher™) a 37°C em condições microaerófilas. As culturas, mantidas em tubos de poliestireno até confluência celular (volume final de 13 mL⁻¹), foram repicadas a cada 72 horas. Além de trofozoítos wild-type, foram mantidas culturas de trofozoitos resistentes a albendazole (Sigma-Aldrich™). A droga foi solubilizada em dimetilsulfóxido e utilizada para manter a concentração final sob 0.1% variação. A indução da resistência a droga iniciou-se pela cultura de parasitos sob a concentração mínima letal de albendazole (0.165 µM, volume final de 13 mL⁻¹). Os trofozoitos foram repicados na presença da droga até adaptação, i.e., 48-72 horas após confluência celular das culturas, e repiques subsequentes (10⁵ trofozoítos) foram realizados em TYI-S-33 com um aumento na concentração de albendazole (0.2 µM, volume final de 13 mL⁻¹) de acordo com Arguello-Garcia et al (2009).

Células de rim de macaco verde (Vero, ATCC CCL-81) foram mantidas em meio RPMI-1640 (Gibco™) suplementado com 10% soro fetal bovino, e 1% Penicilina/Estreptomicina (1000 UI, Gibco™). As culturas foram incubadas a 37°C, 5% CO² até atingir confluência celular.

2.4.2 Isolamento, Quantificação e caracterização de VEs

Para isolamento de VEs do parasito, trofozoítos WT e resistentes a albendazole (R) oriundos de culturas confluentes foram soltos ao manter os tubos de cultura por 15 minutos no gelo. Depois, as culturas foram centrifugadas duas vezes (600xg/5min) e cada pellet suspenso com meio TYI-S-33 sem SAB. Parasitos foram

contados utilizando um hematocítmetro, e diluídos a 1×10^6 por amostra, de acordo com Evans-Osses et al (2017). As amostras foram distribuídas em microtubos de 1.5 mL, num volume final de 1 mL, com adição de 1mM CaCl_2 para indução de vesiculação. Os grupos foram os seguintes: controle (apenas meio), trofozoitos tratados com 0.2 μM ABZ, trofozoitos tratados com 2% dimetilsulfóxido. Os microtubos foram mantidos sob incubação a 37°C, por 1 hora. Depois, pellets de VEs foram coletadas nas seguintes centrifugações: 600xg/5 min, e depois 4000xg/30 min para eliminar o debris celular. Em seguida, o sobrenadante era centrifugado à 15,000xg por 1 hora, e o pellet resultante (VELs) era suspenso em solução tampão salina (PBS 1x). O sobrenadante remanescente foi ultracentrifugado a 100,000xg por 4 horas, e o pellet resultante (VEPs) foi também suspenso em PBS (1x). Ambas as amostras foram mantidas a 4°C até uso. Em experimentos independentes, submetem-se trofozoitos WT e R ao protocolo de vesiculação em diferentes condições de temperatura (4 ou 37°C), por 1 hora, assim como ao tratamento com a MLC (Concentração letal mínima) de nitazoxanida (1,2 μM), uma droga alternativa ao tratamento da giardíase.

VEs foram quantificados baseando-se no método de quantificação protéica, com a técnica de Micro BCA (ThermoFisher™). Para análise de rastreamento por nano-partículas (*Nanoparticle tracking analysis*, NTA, Nanosight, Malvern™) cada amostra foi diluída 1:100 em PBS (1x) e submetida ao Nanosight NS3000, com leituras realizadas em triplicada durante 60 segundos, com vídeos de 10 frames/segundo, temperatura ambiente. Os seguintes parâmetros de operação foram padronizados para cada amostra: obturador de câmera (1492), ganho de câmera (512), limite de detecção (10).

2.4.3 Tratamento de parasitos e células mamíferas com VEs

Inóculos de 10^6 trofozoitos por grupo (triplicatas) foram tratados com 14 μg de VELs ou VEPs, derivados de culturas-controle ou tratadas com 0.2 μM de albendazole. Os parasitos foram mantidos em microtubos de $1,5 \text{ mL}^{-1}$ por 48 horas (37°C), num volume final de 1 mL^{-1} do meio TYI-S-33 suplementado com 10% SAB e 1% penicilina/estreptomicina (10 000UI). Após a incubação, a quantificação de trofozoitos foi realizada pela centrifugação de parasitos não-aderentes do sobrenadante, e contagem de células a partir do pellet, utilizando um hematocítmetro, de acordo com Cotton et al (2014).

2.4.4 Métodos analíticos para a caracterização dos decavanadatos

A produção dos compostos I e II, assim como o preparo das soluções foram conduzidas em água ultrapura (Milli-Q, Millipore tipo 1, resistividade de 18.2 M Ω cm a 25°C). Os reagentes óxido de vanádio (V₂O₅, \geq 99.6%), 3-piridinacarboxamida (nicotinamida, \geq 99.5%), e 4-piridinacarboxamida (isonicotinamida, 99%) foram comprados da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação adicional. Decavanadato de sódio [$\text{Na}_6(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$]_n (NaV10) foi preparado de acordo com Yerra et al (2014). O conteúdo de vanádio (V) foi determinado por titulação com uma solução aquosa de (NH₄)₂[Fe(SO₄)₂] \cdot 6H₂O (0.01 mol L⁻¹), segundo Wang et al (2000). Componentes de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinados por combustão num analisador de elementos Flash EA 1112 (Thermal Scientific, MEDAC Laboratories™). O espectro de absorção utilizado na região infravermelha (400- 4000 cm⁻¹) foi obtido em pellets de KBr de um espectrofotômetro Biorad™ FTS 3500GX, com resolução de 4 cm⁻¹. O espectro de Raman foi obtido num espectrofotômetro de Imagem Renishaw Raman acoplado a um microscópio óptico, que foca radiação incidente até 1 μ m. Um laser He-Ne (632.8 nm) com uma potência incidente de 0.2 mW foi utilizado sobre a região 200-2000 cm⁻¹. O espectro eletrônico foi obtido a partir de uma solução aquosa num espectrofotômetro Lambda 1050 UV-vis_NIR (PerkinElmer™). O espectro 51NMR (105.25 MHz) foi gravado a 295 K em solução D₂O com um espectrômetro Avance 400 (Bruker™), operado a 9.4 T, e equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta (5 mm). Como referência externa, foi utilizado um VOCl₃ (puro, por capilaridade) para o espectro 51V, e seu sinal foi fixado a 0.00 ppm. O espectro foi adquirido usando pulsos calibrados de 90° e scanners de 1024-2048 com atraso de 0.1 s e tempo de aquisição de 0.157 s, num comprimento espectral de 990 ppm (+44 a -946 ppm). As intensidades de sinais foram normalizadas em cada experimento por comparação com o sinal de referência. Análises termogravimétricas (TGA) foram corridas num analisador Jupiter STA449 F3 (Netzsh™), equipado com um forno de carboneto de silício. Amostras (ca. 4 mg) foram aquecidas em chapas de alumínio usando uma mistura de N₂/O₂ como carreador gasoso, de 25 a 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

2.4.5 Síntese dos compostos I e II

O preparo de (3-Hpca)₄[H₂V₁₀O₂₈]·2H₂O·2(3-pca), composto I, envolveu a adição de 10 mL de solução de nicotinamida (0.37 g, 3.0 mM) em uma suspensão de 40 mL de V₂O₅ (0.46 g, 2.5 mM). A suspensão resultante foi homogeneizada e aquecida sob refluxo por 3 horas. O conteúdo do frasco foi filtrado sob vácuo para remover o excesso de V₂O₅. O filtrado foi coberto com uma camada de isopropanol e mantida a 4 °C. Cristais amarelos apropriados para a análise de difração de raios-X de um único cristal formaram-se após 3 dias. A solução estoque foi transferida para outro frasco, e os cristais secos em ar (0.33 g, 0.19 mM). O produto ficou solúvel em água quente e dimetilsulfóxido.

Para o preparo do produto II, uma solução de 0.37 g (3.0 mmol) de isonicotinamida em 10 mL de água foi adicionado à uma suspensão de V₂O₅ (0.46 g, 2.5 mM) em 40 mL de água. Após homogeneização e aquecimento sob refluxo por 3 horas, a suspensão foi filtrada sob vácuo. A formação de cristais amarelos ocorreu após o resfriamento a temperatura ambiente, e foram secos no ar (0.17 g, 0.10 mM). O produto ficou solúvel em água quente e dimetilsulfóxido.

2.4.6 Difração de raios-X de único cristal

As condições experimentais do produto I estão apresentadas na Tabelas 2.

Tabela 2 - Cristalografia e dados de refinamento para (3-Hpca)₄[H₂V₁₀O₂₈]·2H₂O·2(3-pca) (produto I)

Formula elemental	H ₂ O ₂₈ V ₁₀ , 4(C ₆ H ₇ N ₂ O), 2(C ₆ H ₆ N ₂ O), 2(H ₂ O)
Massa Molar/gmol ⁻¹	1732.25
Sistema do cristal	Monoclinic, C2/c (n° 15)
<i>a</i> / Å	25.8951(11)
<i>b</i> / Å	9.5597(4)
<i>c</i> / Å	23.8816(10)
<i>β</i> / °	107.278(2)
Temperatura / K	300(2)
Volume / Å ³	5645.1(4)
Z	4
Densidade/ g cm ⁻³	2.038
F(000)	3456
Coefficiente de absorção/ mm ⁻¹	1.690
Tamanho do cristal/ mm	0.310 x 0.234 x 0.124

θ limites/ °	3.6 a 27.5
Reflexões coletadas	59393
Dados únicos	6469 [R(int) = 0.051]
Dados observados, [I > 2 σ (I)]	5175
Número de parâmetros	516
Qualidade de ajuste em F ²	1.052
R [I > 2 σ (I)], R _w [I > 2 σ (I)] ^(*)	R = 0.030, R _w = 0.075
R, R _w (todos os dados)	R = 0.046, R _w = 0.080
Maior pico de diferença/ e Å ⁻³)	0.44 e -0.32

$w = [\sigma^2(F_o^2) + (0.0389 * P)^2 + 7.4351 * P]^{-1}$ onde $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$

Fonte: O autor (2020).

Para o produto II, a partir de uma amostra sobre óleo, um bloco, ca. 0.129 × 0.091 × 0.034 mm³, foi montado em uma malha MiTeGen™ e fixada em nitrogênio líquido num difratômetro D8 Venture (Bruker™) equipado com um detector Photon 100 CMOS (Bruker™), radiação Mo K α e monocromador de grafite. A intensidade dos dados foram mensuradas por fatia-fina ω - e scans- φ . O número total de reflexões foi gravado, para $\theta_{max} = 27.5^\circ$, resultando em 57 076 dos quais 6081 foram únicos (R_{int} = 0.092); 4752 foram observados com I > 2 σ (I). Dados foram processados usando o programa APEX3 (Bruker™). A estrutura foi determinada por rotinas diretas no programa SHELXS, segundo Sheldrick (2008). Átomos não-hidrogênios foram refinados com parâmetros termais anisotrópicos. Todos os átomos de hidrogênio foram localizados em mapas diferentes, e refinados isotropicamente; restrições aplicaram-se apenas para átomos de hidrogênio ligados a O (4) e N (2). Fatores de dispersão para átomos neutros foram baseados na *International Tables for X-ray Crystallography, 1992*. Softwares na análise foram utilizados em WinGX.34

2.4.7 Ensaio de Inibição de crescimento e aderência em trofozoitos de *G. intestinalis*

Uma suspensão de trofozoitos (100 μ L a 1x10⁵ trofozoitos mL⁻¹) em meio YI-S-33 foi adicionado a tubos de poliestireno, contendo as soluções aquosas do produto I, II e NaV₁₀ (1.0 mmol L⁻¹ em água) diluídas em TYI-S-33 completo. As concentrações finais dos compostos de oxidovanádio foram 0.025, 0.50, 10 e 200 μ mol L⁻¹ num volume final de 13 mL para cada tubo. O meio TYI-S-33 e diluições seriais de albendazole (0.025 a 200 μ mol L⁻¹) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As culturas foram incubadas por 96 horas a 37°C em

5% CO₂, e crescimento celular foi determinado por microscopia óptica utilizando um hematocítmetro. A cada 24 horas, uma alíquota de 10 µL de cada cultura foi removida para determinar a população de trofozoitos no sobrenadante (células não-aderidas). Depois disso, 10 µL do meio foram adicionados para o volume restante de cada cultura, que por sua vez foi resfriada em gelo por 15 minutos para promover a soltura dos parasitos. Novas alíquotas de 10 µL foram subsequentemente coletadas das culturas para determinar a população total, e os tubos foram novamente incubados a 37°C, após adição de 10 µL do meio. A estimativa dos trofozoitos foi obtida pela relação dos trofozoitos totais-sobrenadante.

2.4.8 Investigação dos polioxidovanadatos na aderência de parasitos em tubos de poliestireno

Culturas de trofozoitos de *G. intestinalis* foram mantidas em tubos de poliestireno, com meio TYI-S-33 completo até confluência (13 mL, 1x10⁶ mL⁻¹). Os produtos I, II e NaV₁₀ foram adicionados em concentrações que variavam de 0.025 a 200 µM/ L⁻¹. O meio de cultura e albendazole (0.025 a 200 µmol L⁻¹) foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. A incubação, amostragem e contagem foram realizadas a cada 24 horas, num intervalo de tempo de 96 horas, como o protocolo descrito acima.

2.4.9 Investigação do efeito em co-culturas

Células Vero foram semeadas em placas de 24 poços por 48 horas, a 37 °C em 5% CO₂ até 100% de confluência em RPMI-1640 com 10% SFB e 1% penicilina/estreptomicina (10000 UI). O sobrenadante foi removido, e as monocamadas de células Vero foram lavadas com RPMI-1640, seguido da adição de 3x10⁵ trofozoitos (100 µL) num volume final de 1 mL⁻¹ de RPMI-1640. As placas foram incubadas a 37°C por 3 horas. Em cada poço, o sobrenadante foi retirado, e produto I, II e NaV₁₀ foram adicionados numa concentração final de 10 µmol L⁻¹ em 1 mL de RPMI-1640 suplementado com 10% SFB. Depois de uma incubação a 37 °C, trofozoitos não-aderentes foram quantificados por hematocítmetro através de uma alíquota de 10 µL do sobrenadante em 24, 48 e 72 horas. Depois, o sobrenadante foi removido, e a monocamada lavada com RPMI. Os trofozoitos restantes (aderidos) foram soltos pela adição de 1mL de meio RPMI (0 a 4°C) e contados após 5 minutos como descrito acima. O número de trofozoitos aderidos à

monocamada de células Vero foi estimado pela diferença entre parasitos não-aderidos e aderidos.

2.4.10 Ensaio de citotoxicidade dos decavanadatos em células Vero

Células Vero (10^4) foram semeadas em placas de 96 poços e cresceram a 37°C em 5% CO_2 e até confluência em RPMI-1640 contendo 10% SFB 1 1% penicilina/estreptomicina (10 000 UI). Células foram tratadas com os derivados de vanadato (NaV_{10} , produto I, II) e albendazole a 0.025, 10 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O volume foi ajustado para 100 μL de meio/poço. Após 96 horas, o sobrenadante foi removido, e as células foram lavadas com 100 μL de PBS (1x). Depois, as células foram fixadas com metanol absoluto (50 μL) por 10 minutos, e 50 μL de cristal violeta 0.2% em etanol/água (2% v/v) foi adicionado a cada poço. Após 2 minutos, os poços foram exaustivamente lavados com 200 μL de PBS (1x). A eluição foi realizada com uma solução de citrato de sódio (0.05 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 minutos), e a absorbância foi determinada num leitor de espectrofotometria de placas.

2.4.11 Análise estatística

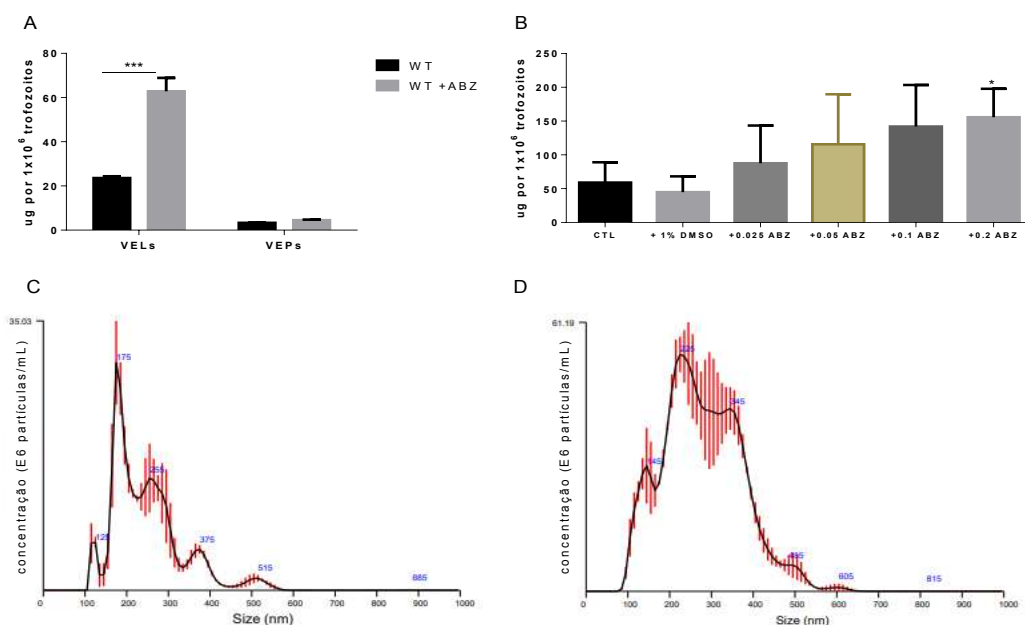
Os experimentos foram conduzidos em duplicatas independentes. A inibição do crescimento (GI_{50}) foi determinada pelo Graphpad™ Prism 6, utilizando ANOVA de dois fatores. Os valores foram representados como média \pm desvio-padrão das médias.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 O tratamento de *G. intestinalis* com albendazole aumenta a produção de vesículas extracelulares largas

Trofozoítos WT e resistentes a albendazole foram tratados com a droga. Através de quantificação proteica, foi possível observar um aumento na produção de VELs por células WT, mas não para VEPs, após tratamento com 0.2 μ M de albendazole (Figura 14A). Investigou-se se o efeito seria produzido pelo veículo em si (DMSO), e qual concentração causaria um aumento na vesiculação. Desta forma, tratamos parasitos com concentrações que iniciavam abaixo da MLC para o albendazole. A Figura 14B indica que a maior produção de VELs não está relacionada ao veículo, e que um aumento na produção de vesículas está associado a concentrações maiores do que a MLC. A técnica de NTA demonstra a concentração de vesículas produzidas por parasitos WT sem a droga (Figura 14C) ou com tratamento de albendazole (Figura 14D).

Figura 14 – O tratamento de parasitos com albendazole estimula a liberação de vesículas extracelulares largas. A. Quantificação proteica (MicroBCA) de diferentes populações de VEs de parasitos WT tratados ou não com albendazole. B. Quantificação proteica (MicroBCA) de VELs produzidas por parasitos tratados com diferentes concentrações de albendazole. C-D. Concentração de VELs por NTA de parasitos WT sem tratamento (C) ou tratamento com albendazole (D). Os dados são representados por três experimentos independentes, como média do desvio-padrão. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$; versus o grupo correspondente, indicado por linha.

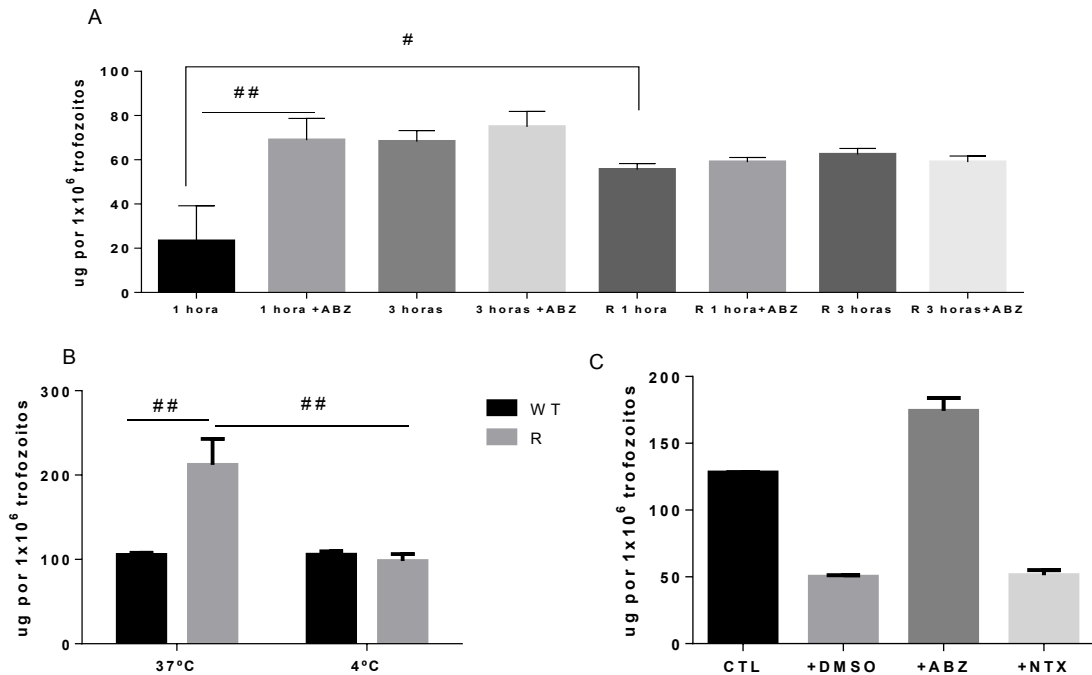


Fonte: O autor (2020)

2.5.2 Parasitos resistentes a albendazole apresentam uma liberação maior de VELs

Para estudar os efeitos do tratamento de parasitos com albendazole, uma das drogas mais comuns no tratamento contra giardíase, decidiu-se selecionar parasitos resistentes a partir de culturas axênicas. Trofozoitos foram repicados na no meio de cultura com albendazole por 48-72 horas, e depois repicados para uma cultura fresca (10^5 células), sempre na presença da droga. No momento em que se obtinha uma confluência celular das culturas após o tratamento (i.e. resistência/tolerância à respectiva concentração da droga), o próximo repique era realizado com um aumento na concentração de albendazole (até alcançar $0.2 \mu\text{M}$, volume final de 13 mL^{-1}) de acordo com Arguello-Garcia et al (2009). O processo de seleção de parasitos resistentes a $0.2 \mu\text{M}$ de albendazole levou 12 semanas. Células resistentes na presença ou ausência da droga produziram uma quantidade de VELs significativamente maior do que parasitos WT durante 1 hora de vesiculação. Curiosamente, células resistentes liberam uma concentração maior de VEs até mesmo sem a presença da droga (Figura 15A). Para investigar se o aumento na produção de VELs estaria relacionado a um processo dependente de energia, parasitos R foram estimulados a produção de vesículas em 37 ou 4°C . Interessantemente, trofozoitos submetidos a menor temperatura durante a vesiculação tiveram uma produção menor de VELs (Figura 15B). Isso sugere que a produção de VELs em maior quantidade pelas células resistentes envolve uma via dependente de energia. Ainda, trofozoitos resistentes a albendazole, mas tratados com a MLC de outro composto giardicida, nitoxanida, não apresentaram maior vesiculação (Figura 15C).

Figura 15 – Parasitos resistentes a albendazole são capazes de liberar uma concentração maior de VELs. A. Quantificação proteica (MicroBCA) de VELs de parasitos WT ou R em diferentes intervalos de tempo, tratados ou não com albendazole. B. Quantificação proteína (MicroBCA) de VELs de parasitos WT ou R estimulados a produção de vesículas em diferentes temperaturas. C. Quantificação proteica (MicroBCA) de VELs de parasitos WT tratados com albendazole, seu veículo (DMSO) ou nitazoxanida. Os dados são representados por três experimentos independentes, como média do desvio-padrão. # $P \leq 0.05$, ### $P \leq 0.01$, #### $P \leq 0.001$; versus o grupo correspondente, indicado por linha.

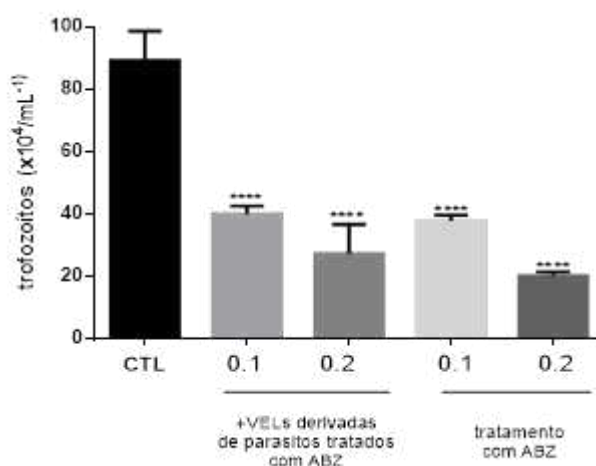


Fonte: O autor (2020).

2.5.3 VELs derivadas de parasitos tratados com droga possuem efeito citotóxico

Para demonstrar a presença da molécula ativa da droga em VELs, trofozoitos WT tratados num período de 48 horas com 15 µg de VELs (liberadas de parasitos em contato com a droga) foram contados num hematocítmetro. Parasitos tratados com VELs oriundas de culturas com albendazole cresceram menos, possivelmente com uma maior morte de parasitos, comparado ao controle (Figura 16).

Figura 16 – VELs derivadas de trofozoitos WT tratados com albendazole (0.1 ou 0.2 µM) apresentam efeito citotóxico. Os dados são representados por três experimentos independentes, como média do desvio-padrão ****P ≤ 0.0001, versus o grupo controle.



Fonte: O autor (2020).

2.5.4 Síntese dos decavanadatos associados com homólogos orgânicos

Os complexos de decavanadato, nicotinamida, (3-Hpca)₄[H₂V₁₀O₂₈] 2H₂O.2(3-pca), chamado de produto I, e isonicotinamida, (4-Hpca)₄[H₂V₁₀O₂₈] 2(4-pca), chamado de produto II foram produzidos utilizando V₂O₅ como reagente inicial. Tentativas de utilizar NH₄VO₃ e NaVO₃ resultaram na cristalização dos produtos contaminados com cátions inorgânicos, ou do decavanadato inorgânico em questão.

2.5.5 Análises de Difração de Raios-x de cristal único

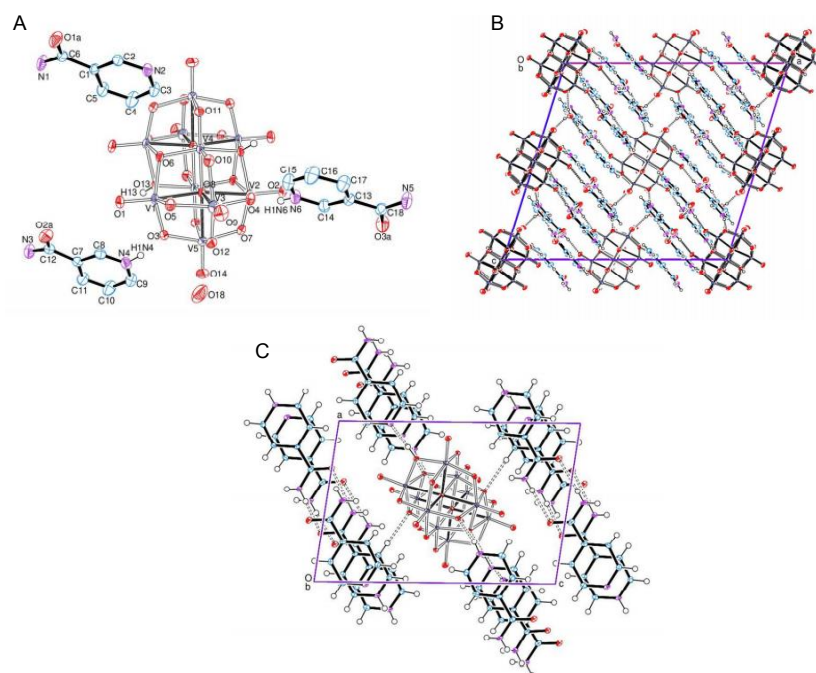
As estruturas dos produtos I e II apresentam quatro cátions orgânicos balanceando a carga final do ânion [H₂V₁₀O₂₈]⁴⁻, junto a duas moléculas orgânicas neutras co-cristalizadas. Duas moléculas de água completam o cristal do produto I, enquanto no produto II, a obtenção do cristal ocorre por um sal anidro.

Os polioxidoanions do produto I e II consistem em octaedros VO₆ que dividem 10 arestas, e exibem ângulos e ligações similar às dos outros decavanadatos. Distâncias entre os ligamentos V-O nos fragmentos V=O (1.60 Å) < V-μ₂-O (1.85 Å) < V-μ₂-OH (1.92 Å) < V-μ₃-O (2.00 Å) < V-μ₃-OH (2.05 Å) < V-μ₆-O (2.23 Å) surgiram da densidade eletrônica decrescente sobre as pontes de oxigênio terminais. As ligações V-O em V(1)-O(9), V(2)-O(9)_i, V(3)-O(9), e V(5)-O(9)_i, no limite de 2.22-2.35 Å são mais longas do que o esperado para a soma dos raios de van der Waals mas estão dentro do observado para vários óxidos de vanádio (Hardcastle et al., 1991). Os agregados V₁₀ dos produtos I e II são protonados em diferentes sítios (μ₃-O no produto I, μ₂-O para II) com uma distância

média O-H de 0.84 (± 0.01) Å. Cálculos de mecânica quântica pelo método Hartree-Fock foram demonstrados para oxigênios de tripla ligação nos ânions de decavanadato. Constituem um alto caráter alcalino, e são candidatos naturais para sítios de protonação (Kempf et al., 1992). No entanto, já se conhece a presença de redes de hidrogênio em íons que afetam sítios de protonação nos V_{10} , como observado nos produtos I e II (Bosnjakovic-Pavlovic et al., 2011).

No produto II, a rede de ligação de hidrogênios tridimensional envolve o polioxiânion, os cátions, e as moléculas de isonicotinamida entorno (Figura 17A). As porções orgânicas interagem com cada uma pelas porções amidas e também com o decavanadato pelas pontes de hidrogênio envolvendo o nitrogênio da piridina. Diferente do caráter anidro do produto II, o cristal do produto I inclui duas moléculas de água por ânion, resultando numa rede tridimensional de hidrogênios mais extensa. Ela também envolve o polioxiânion, os cátions de nicotinâmídicos, e as moléculas de nicotinamida (Figura 17B). No produto I, a posição do grupo amida na nicotinamida previne interações entre as porções amidas, impactando no arranjo supramolecular dos diferentes componentes e cargas do cristal. Em ambas estruturas sólidas, os homólogos orgânicos possuem estabilidade devido às interações $\pi-\pi$, com distâncias centroides-centroides de 3.5 Å entre os anéis aromáticos.

Figura 17 – Estrutura química dos derivados de decavanadatos. A. Representação ORTEP-3 do produto I, demonstrando apenas a cristalografia das partes orgânicas. B. Visão do empacotamento do produto I, ao longo do axis *b*, mostrando ligações de hidrogênio que conectam os ânions de decavanadato com a nicotinamida e moléculas de água. C. Visão do empacotamento das porções do produto II ao longo do axis *b*.

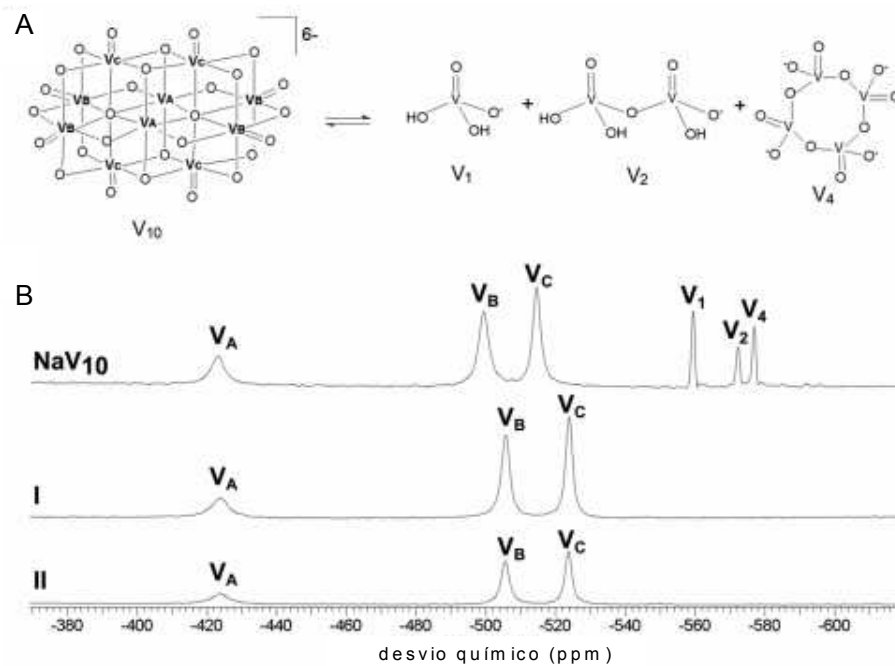


Fonte: O autor (2020).

2.5.6 Espectroscopia das soluções:

Como esperado, os produtos I e II foram silenciosos na espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, confirmando a ausência de reações redox entre as moléculas orgânicas e o centro de vanádio do ânion. Ambos os compostos também foram analisados por espectroscopia nuclear de ressonância magnética, na concentração de 1.0 mmol L^{-1} para avaliar a estabilidade em solução aquosa (Figura 18A). Os produtos I e II geraram espectros similares, demonstrando sinais de $[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{4-}$ a -425 , -507 e -525 ppm correspondentes ao átomo de vanádio central, os quatro vanádios externos da estrutura central, e os quatro vanádios no ânion, respectivamente (Figura 18B).

Figura 18 – Espectroscopia dos derivados de decavanadato. A. Representação da especiação pH-dependente do ânion de decavanadato. Para o decavanadato, V^A (átomo vanádio central), V^B (4 átomos de vanádio no plano central), V^C (átomos de vanádio do ânion). B. Espectro NMR (105.25 MHz) gravado em D_2O para NaV^{10} em comparação com produtos I e II (soluções 1.0 mmol L^{-1}). Os pontos mensurados de pH para as amostras foram iguais a 5 para os produtos I e II, e 7 para NaV^{10} .



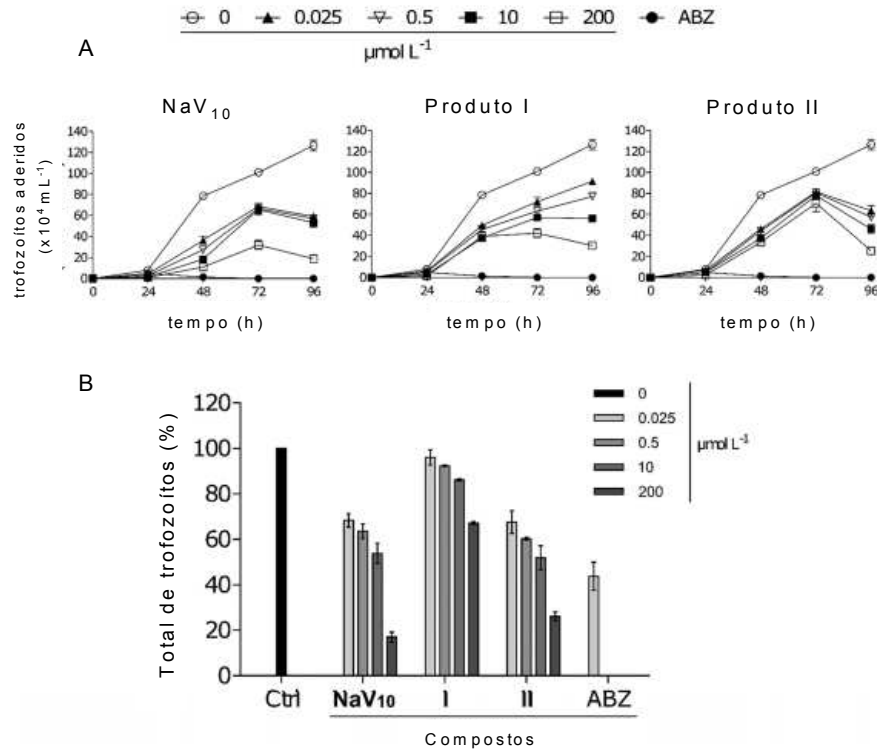
Fonte: O autor (2020).

2.5.7 Os efeitos dos sais de decavanadato em *G. intestinalis*: ensaios de adesão e crescimento

Os estudos para avaliação de efeitos biológicos dos sais de decavanadato foram realizados para *G. intestinalis*, investigando os efeitos de NaV₁₀, produto I e II no crescimento e adesão de parasitos em tubos de poliestireno, utilizando um meio que simula as condições físico-químicas do intestino delgado (Keister, 1983). Um efeito inibitório na aderência dos trofozoitos foi observado para os três polioxidovanadatos depois de 48 horas de tratamento, alcançando 40-50% na inibição de aderência na menor concentração (0.025 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Figura 19).

Figura 19 – Ensaio in vitro de adesão do parasito após efeito dos sais de decavanadato. A. Ensaio de cinética de aderência dos trofozoitos em superfície de poliestireno após tratamento com NaV₁₀, produtos I e II (0.025 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Desvios-padrão foram menores que $\pm 5 \times 10^4$, $\pm 4 \times 10^4$, e $\pm 8 \times 10^4$ trofozoitos aderidos/ mL^{-1} para NaV₁₀, produtos I e II, respectivamente. As barras de erro estão de acordo com o tamanho dos símbolos. B. Percentagem da inibição no crescimento de trofozoitos de *G. intestinalis* após tratamento com albendazole, NaV₁₀, produtos I

e II (0.025 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após 96 horas. A contagem total de trofozoitos (138.5×10^4) foi padronizada como 100% do crescimento (controle negativo).



Fonte: O autor (2020).

Interessantemente, a cinética de inibição variou com os diferentes compostos. O tratamento com as soluções de NaV₁₀ foi o mais efetivo, com um efeito inibitório de 70-90% na aderência com o uso de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a partir de 48 horas. A efetividade da inibição com NaV₁₀ foi mantida pelo tempo com 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mas concentrações menores parecem nivelar em 50% de inibição para períodos maiores. A adição do produto II demonstrou uma inibição de adesão no estágio inicial da cultura, mas não resultou num efeito dose-dependente até 72 horas. Todavia, em 96 horas após o início da cultura, a aderência dos parasitos decresceu significativamente, dependendo da concentração, resultando em 20% de adesão em 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

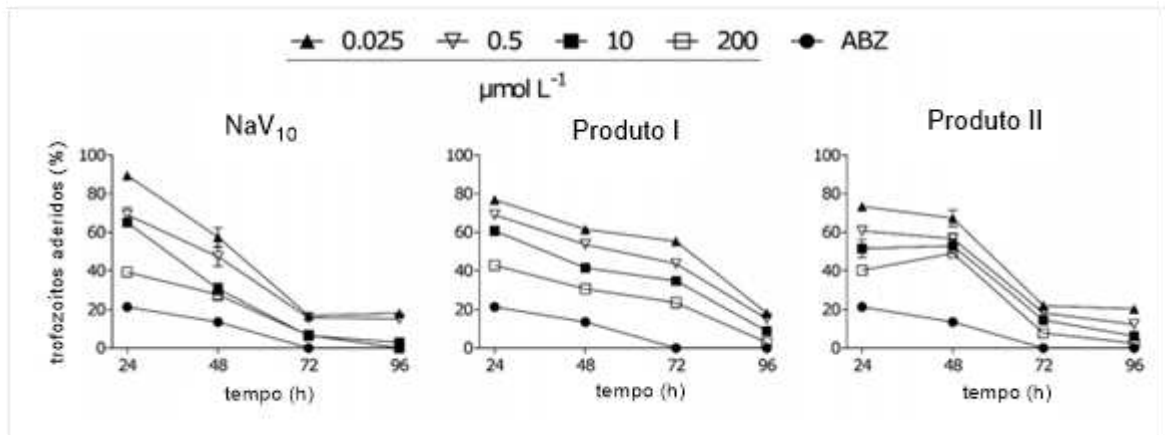
O tratamento com produto I, por sua vez, produziu uma relação dose-dependência mais clara a 48 horas, chegando a 30% de aderência apenas em 96 horas de cultura, na maior concentração. O padrão de inibição na aderência

complexo e distinto entre os compostos sugere relações diferentes nas interações dos polioxidovanadatos e seus respectivos íons, assim como dos compostos com os trofozoitos sobre condições *in vitro*. Apesar das diferenças observadas durante o período de experimento, os ensaios realizados com NaV¹⁰, produto I e II, efeitos similares foram obtidos em 96 horas com 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com aderência média de 20% do total de parasitos, comparando à cultura controle. Baseando-se neste resultado, a densidade total de parasitos nas culturas foi estimada depois de 96 horas, como a soma dos trofozoítos aderentes e não-aderentes. Conforme demonstrado na Figura 14B, o crescimento celular foi inibido pela incubação com NaV¹⁰ e com o produto II. Até mesmo com a menor concentração avaliada, exibindo um GI₅₀ de 10 $\mu\text{M L}^{-1}$. No entanto, a resposta média da adição do produto I foi menos pronunciada, com uma inibição do crescimento de apenas 33% a 200 $\mu\text{M L}^{-1}$.

2.5.8 O efeito dos polioxidovanadatos na adesão *in vitro* dos trofozoitos

Considerando a adesão um fenômeno fundamental para a persistência do parasito em seu hospedeiro, investigou-se a capacidade dos polioxidovanadatos em desaderir trofozoitos de uma cultura com confluência celular, em culturas axênicas ou células Vero. Os experimentos com trofozoitos aderidos aos tubos de poliestireno demonstraram que os três compostos aumentaram a soltura em função do tempo, resultando numa soltura mínima de 80% em 96 horas (Figura 20). Um decréscimo significativo na adesão foi observado de 48-72 horas com parasitos tratados com NaV¹⁰ e do produto II, enquanto a resposta principal do produto I ocorreu apenas de 72-96 horas.

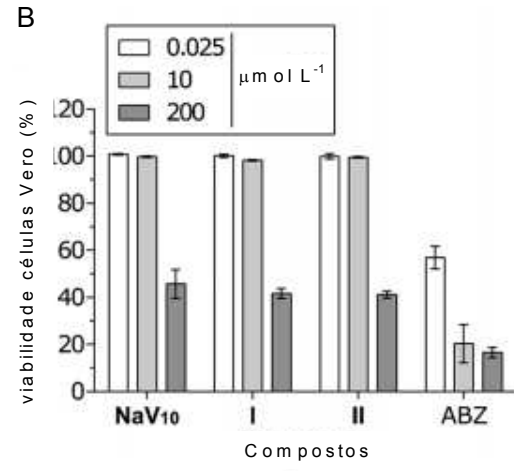
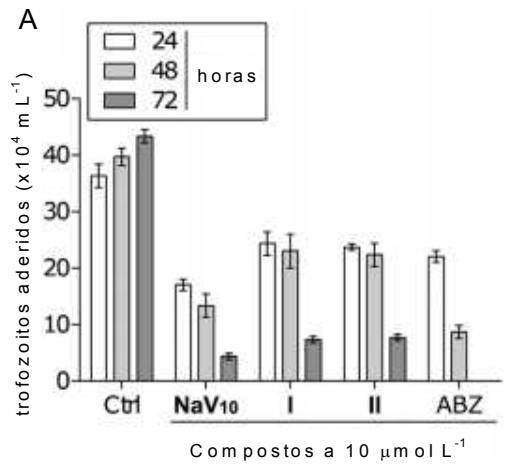
Figura 20 – Cinética de desadesão dos trofozoitos a partir de uma superfície de poliestireno (após confluência de cultura) tratados com diluições seriadas de NaV¹⁰, produto I e II (0.025 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e albendazole (ABZ, 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Desvios-padrão foram inferiores a ± 5 , ± 3 e $\pm 5\%$ para NaV¹⁰, produto I e II, respectivamente. Em vários pontos, barras de erros estão do tamanho dos símbolos. O crescimento de parasitos apenas na presença do meio de cultura foi considerado o controle negativo.



Fonte: O autor (2020).

Em relação à co-cultura, trofozoitos aderidos à uma monocamada de células Vero foram tratados com albendazole, NaV₁₀, produtos I e II apenas na concentração GI50 (10 µmol L⁻¹) e os trofozoitos que permaneceram aderidos após coleta do sobrenadante e lavagem foram contados até 72 horas (Figura 21). O tratamento com todos os compostos resultou em menores contagens de parasitos aderidos, quando comparados com o controle negativo, corroborando seus efeitos giardicidas evidenciados em experimentos anteriores. Curiosamente, depois de 24 horas os efeitos dos três sais de decavanadato foi similar ao albendazole, mas após 48 horas, a droga foi significativamente mais efetiva, com NaV₁₀ apresentando um efeito mais pronunciado do que os compostos I e II.

Figura 21 – Efeitos dos sais de decavanadato em co-culturas. A. Efeito de NaV₁₀, produtos I e II (10 µmol L⁻¹) na adesão de parasitos em monocamadas de células Vero. Nos tempos indicados, os trofozoitos aderidos foram contados. B. Efeito citotóxico dos polioxidovanadatos em células Vero. As células foram incubadas por 96 horas com 200, 10 e 0.025 µmol L⁻¹ de cada composto, ou apenas com meio de cultura. A viabilidade celular foi determinada com o método de cristal violeta.



Fonte: O autor (2020).

2.6 DISCUSSÃO

Estudos envolvendo vesículas extracelulares e a transferência de fenótipos de resistência a drogas já foram descritos em modelos de câncer (Federici et al., 2014; Soldevilla et al., 2014; Zhang et al., 2017; Cao et al., 2017). Existem múltiplos mecanismos envolvidos no fenômeno, como a transferência de canais iônicos, lipídeos, proteínas ou microRNAs para uma célula receptora. Além disso, drogas podem ser secretadas pelas VEs quando células são tratadas (Sousa et al., 2015; Gong et al., 2013) como o presente estudo sugere, através de parasitos tratados com albendazole. Experimentos *in vivo* e *in vitro* sobre o tema propõe que células sensibilizadas por um tratamento com drogas aumentam a produção de VEs (Aubertin et al., 2016). Desta forma, células resistentes de vários modelos são capazes de liberar uma quantidade significativamente maior de VEs sob estresse terapêutico (Ifergan et al., 2005; Goler-Baron et al., 2011; Yin et al., 2012; Xavier et al., 2020). Somadas em conjunto, evidências sugerem que VEs provem um papel no metabolismo de drogas, em células sensíveis e resistentes.

O presente trabalho reportou um aumento na liberação de VELs a partir de trofozoitos tratados com uma droga (albendazole). Também se demonstrou que populações resistentes às concentrações citotóxicas da droga possuem um perfil de maior liberação de VELs, sugerindo que esta forma de comunicação celular tem um papel no perfil de tolerância à droga deste protozoário. É importante ressaltar que em outros estudos (Arguello-García et al., 2009) foram obtidos parasitos com uma resistência maior à droga. Estes testes envolvem tempo e uma contínua manutenção das culturas. Mais estudos são necessários para demonstrar o carreamento de drogas por VEs de parasitos, tais como a estimativa da concentração de espécies químicas ativas da droga por cromatografia líquida de alta eficiência, e a identificação de morte celular pós-tratamento com VELs derivadas de parasitos sob tratamento, por citometria de fluxo. Uma investigação da produção de VELs em diferentes temperaturas indica que o perfil de maior produção de VEs não se mantém a 4°C. É provável que o estímulo para a liberação desta população de vesículas esteja relacionado com alguma via dependente da atividade metabólica do parasita. São necessários ensaios alternativos, como o uso de inibidores de vias energéticas, como a glicólise, para investigação da relação entre a produção de VELs e a dependência de energia.

Neste estudo, foram sintetizados sais de decavanadato com nicotinamida (3-piridinacarboxanida) e isonicotinamida (4-piridinacarboxanida), produtos I e II respectivamente e investigados os efeitos do decavanadato de sódio (NaV_{10}), produtos I e II na viabilidade ou adesão de trofozoítos de *G. intestinalis*.

O produto II foi obtido pela primeira vez no presente trabalho. O produto I apresenta uma estrutura cristalina previamente descrita em Pacigova et al (2007), mas não existem estudos relacionados à pureza ou rendimento. Neste estudo, os produtos I e II foram obtidos na forma pura.

Uma estrutura cristalina do produto I foi reportada por Pacigova e colaboradores (2007). Foi publicada a estrutura do composto, e apesar de compartilhar os mesmos parâmetros que o composto I, é formado por um sal de nicotinamida de um ânion de decavanadato completamente desprotonado, $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$, sem moléculas orgânicas co-cristalizadas.

Em anos recentes, estratégias sintéticas para a combinação de estruturas químicas distintas, através de alvos ou atividades específicas foi amplamente considerado. Os decavanadatos foram empregados para a produção de tais materiais. No entanto, a co-cristalização observada neste trabalho, considerando os cátions orgânicos e moléculas neutras de V_{10} , é menos comum, e a maior parte das moléculas já estudadas inclui outras espécies inorgânicas (Bosnjakovic-Pavlovic et al., 2010). Exemplos similares aos produtos I e II são $(\text{C}_6\text{N}_2\text{H}_{14})_2 \cdot (\text{C}_6\text{N}_2\text{H}_{13})[\text{V}_{10}\text{O}_{27}(\text{OH})] \cdot (\text{C}_6\text{N}_2\text{H}_{12}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, obtivas do octano de 1,4-diazabicyclo-[2.2.2] em diferentes estados de protonação, e $(\text{H}_2\text{en})_3[\text{H}_3\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot (\text{en}) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com en= etilenodiamina (Correia et al., 2004). Em comparação Bosnjakovic-Pavlovic et al (2009) descreveram um co-cristal de decavanadato que contém uma relevante molécula de valor biológico, citosina, em ambas as formas protonada e desprotonada, mas ligada a cátions de sódio.

Como o pH nas amostras dos produtos I e II foi igual a 5, a ausência de sinais relacionados aos vanadatos de menor nuclearidade é explicado pela estabilidade do decavanadato em meio ácido (pH 2-6) (Gorzsas et al., 2009; Pettersson et al., 1983). As soluções de NaV_{10} , em contraste, mostraram sinais de espectroscopia nuclear a δ -424, -500 e -515 ppm, relacionados às três formas diferentes de vanádio em $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$. Picos de ressonância a frequências menores são consistentes com a presença de $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$ (V_1), $[\text{HV}_2\text{O}_7]^{3-}$ (V_2), e $[\text{V}_4\text{O}_{12}]^-$ (V_4) a -

560, -573 e -578 ppm, respectivamente. A especiação de V_{10} a pH=7 já foi descrita em outros estudos (Aureliano et al., 2009; Pettersson et al., 1983).

A patogênese de *G. intestinalis* não está completamente descrita, mas a adesão dos trofozoitos pelo disco ventral ao epitélio intestinal é um evento fundamental para sua persistência no hospedeiro (Woesser et al., 2012). Fatores que interferem com a adesão celular, como a presença de substâncias citotóxicas ou hipermotilidade intestinal (Andersen et al., 2006; Gutierrez-Gutierrez et al., 2017). A diferença na performance do produto I quando aderência (Figura 4A) e inibição do crescimento (Figura 4B) são comparadas sugerem que o tratamento com o produto I afeta os mecanismos de adesão dos trofozoítos aos tubos de poliestireno sem lise celular, diferindo dos possíveis efeitos do produto II, e do NaV_{10} .

As vias metabólicas e fatores de virulência de *G. intestinalis* são menos descritas do que em procariontes, e até mesmo para outros protozoários (Ankarklev et al., 2010; Nosala et al., 2015). Em relação à atividade de complexos de vanádio, alguns compostos oxidovanádios já foram estudados quando aos efeitos contra protozoários como *Trypanosoma spp*, *Leishmania spp.* e *Entamoeba histolytica* (Pessoa et al., 2015). Os mecanismos de ação destes compostos ainda não foram elucidados, mas os estudos sugerem que há interferência na atividade biológica mitocondrial e/ou intercalação de DNA. Como *Giardia* contém uma organela similar à mitocôndria chamada mitosomo (Tovar et al., 2003) mais estudos sobre a ação dos sais de V_{10} poderiam estimar os alvos da célula em questão. Em relação ao decavanadato, o efeito de $(NH_4)_6[V_{10}O_{28}] \cdot 6H_2O$ foi avaliado na inibição de crescimento in vitro em *Leishmania tarentolae* (Turner et al., 2012). Observou-se que, apesar de uma discreta inibição no crescimento dos parasitos, a adição de V_{10} às culturas resultaram na redução da mobilidade do parasito, com um decréscimo do potencial de virulência. Outro estudo demonstrou que decavanadatos e ortovanadatos são excelentes inibidores de fosfatases ácidas secretadas por *L. tarentolae* (Dorsey et al., 2018), alvos em potencial para o tratamento da leishmaniose. De acordo com o estudo, quando as moléculas são comparadas, decavanadato demonstra ser o melhor inibidor das fosfatases ácidas.

No presente estudo, foi observada tanto atividade anti-aderência quanto a inibição do crescimento dos três sais de decavanadato, em alguma extensão. O efeito observado foi moderado, se comparado à uma das drogas de referência para a parasitose, albendazole, nas primeiras 48 horas. Porém, identificou-se uma

intensificação nos efeitos após este período, enquanto 100% dos trofozoitos foram soltos quando a maior concentração ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi testada.

Como o número de oxidovanadatos utilizados neste estudo foi pequeno, a identificação de espécies químicas geradas no meio de cultura, assim como o feito combinado com outros cátions orgânicos na aderência e viabilidade do parasito ainda devem ser avaliadas antes de uma conclusão mais abrangente. A toxicidade em células Vero durante o tratamento com os três compostos foi menor do que com o albendazole. A 0.025 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, os sais não afetaram a viabilidade das células mamíferas, enquanto as mesmas concentrações da droga reduziram a viabilidade para aproximadamente 50 e 20%, respectivamente. Apenas na maior concentração ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) os compostos reduziram a viabilidade das células para 50%, enquanto o albendazole a reduziu para menos de 20% (Figura 6B).

Resultados similares foram reportados para o decavanadato de sódio, e decavanadato-quitosana. Shah e colaboradores (2014) investigaram os efeitos destes compostos em células mamíferas, demonstraram que ambos apresentaram baixa citotoxicidade em células Vero, mas com alta eficácia contra células HeLa (linhagem de câncer cervical). Em contraste, alguns compostos de vanádio, incluindo o decavanadato, foram identificados como tóxicos para linhagens cancerosas e normais, com hepatócitos (Li et al., 2010). Embora sejam necessários mais estudos sobre os efeitos tóxicos dos sais de decavanadato, as condições experimentais deste trabalho demonstraram uma segurança em células Vero, e um efeito giardicida, sugerindo perspectivas promissoras para o design de candidatos terapêuticos contra a parasitose.

2.7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, os polioxidovanadatos NaV_{10} , produto I e II demonstraram uma atividade giardicida e anti-aderente contra trofozoitos mantidos in vitro ou em co-cultura. Esta é uma nova atividade descrita para compostos de decavanadato. Além disso, a adição de sais de V_{10} resultou numa toxicidade menor para células mamíferas do que uma droga utilizada para a tratamento da giardíase. Os resultados sugerem um potencial farmacológico como novos agentes antimicrobianos. Mecanismos de resistência a albendazole poderiam estar associados a liberação de vesículas e seriam dependentes da atividade metabólica parasitaria.

REFERÊNCIAS

Abboud P, Lemée V, Gargala G, Brasseur P, Ballet JJ, Borsa-Lebas F, Caron F, Favennec L. Successful treatment of metronidazole- and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis** (2001) 15;32(12):1792-4.

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin. Microbiol. Rev.** (2001) 14:447–475.

Allain T, de Lamache DD, Motta JP, Feener T, Reimer R, Buret AG. Effects of Western Diet on Giardiasis: A Role for Fatty Acids and Gut Microbiota in the Persistence and Severity of *Giardia* Infections. **FASEB J** (2020), V.33, I.1

Amorim MG, Valieris R, Drummond RD, Pizzi MP, Freitas VM, Sinigaglia-Coimbra R, Calin GA, Pasqualini R, Arap W, Silva IT, Dias-Neto E, Nunes DN. A total transcriptome profiling method for plasma-derived extracellular vesicles: applications for liquid biopsies. **Sci Rep.** 2017 Oct 31;7(1):14395.

Andersen YS, Gillin FD, Eckmann L. Adaptive Immunity-Dependent Intestinal Hypermotility Contributes to Host Defense Against *Giardia* spp. **Infect. Immun.** (2006), 74, 2473–2476.

Andersson JO, Sjorgren AM, Horner DS, Murphy CA, Dyal PL, Svard SG, Logsdon Jr. JM, Ragan MA, Hirt RP, Roger AJ. A genomic survey of the fish parasite *Spironucleus salmonicida* indicates genomic plasticity among diplomonads and significant lateral gene transfer in eukaryote genome evolution. **BMC Genomics.** 2007 8:51. doi:10.1186/1471-2164-8-51

Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. **Nat Rev Microbiol.** 2010 Jun;8(6):413-22.

Ansell BR, McConville JMc, Baker L, Korhonen PK, Emery SJ, Svard SG, Gasser RB, Jex AR. Divergent Transcriptional Responses to Physiological and Xenobiotic Stress in *Giardia duodenalis*. **Antimicrob Agents Chemother** 2016 60:6034-6045.

Argüello-García R, Cruz-Soto M, González-Trejo R, Luz María T., Maldonado P, M. Bazán-Tejeda L, Mendoza-Hernández G, Ortega-Pierres G. An antioxidant response is involved in resistance of *Giardia duodenalis* to albendazole. **Front Microbiol.** 2015; 6: 286.

Arguello-Garcia R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: Variability and variation in gene expression. **Infect. Genet. Evol.** (2009) 9 (6): 1057-1064.

Argüello-García R, Leitsch D, Skinner-Adams T, Ortega-Pierres MG, Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. **Adv Parasitol** (2020) ;107:201-282.

Atayde VD, Suau HA, Townsend A, Hassani K, Kamhawi S, Olivier M. Exosome secretion by the parasitic protozoan *Leishmania* within the sand fly midgut. **Cell Rep.** (2015); 13(5): 957–967.

Aubertin K, Silva AKA, Luciani N, Espinosa A, Djemat A, Charue D, Gallet F, Blanc-Brude O, Wilhelm C. Massive release of extracellular vesicles from cancer cells after photodynamic treatment or chemotherapy. **Sci Rep.** (2016) 18;6:35376.

Aureliano M, Ohlin CA. Decavanadate In Vitro and In Vivo Effects: Facts and Opinions. **J. Inorg. Biochem** (2014), 137, 123–130.

Aureliano M. Decavanadate Toxicology and Pharmacological Activities: V₁₀ or V₁, Both or None? **Oxid. Med. Cell. Longev.** (2016), 6103457.

Bartelt LA, Sartor RB. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. **F1000Prime Rep.** 2015; 7: 62.

Benchimol M. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. **FEMS Microbiol Lett.** 2004 Jun 1;235(1):81-7.

Bosnjakovic-Pavlovic´ N, Prevost J, Spasojevic de Bire A.´Crystallographic Statistical Study of Decavanadate Anion Based Structures: Toward a Prediction of Noncovalent Interactions. **Cryst. Growth Des.** (2011), 11, 3778–3789.

Bosnjakovic-Pavlovic N, Spasojevic-de Bire A, Tomaz I,´Bouhaida N, Avcilla F, Mioc UB, Pessoa JC, Ghermani NE. Electronic Properties of a Cytosine Decavanadate: Toward a Better Understanding of Chemical and Biological Properties of Decavanadates. **Inorg. Chem.** (2009), 48, 9742–9753.

Bougie I, Bisailon M. Inhibition of a Metal-Dependent Viral RNA Triphosphatase by Decavanadate. **Biochem. J** (2006) 398, 557– 567.

Brasseur P, Favennec L. Two cases of giardiasis unsuccessfully treated by albendazole. **Parasite** (1995) 2(4):422.

Buck AH, Coakley G, Simbari F, McSorley HJ, Quintana JF, Bihan TL, Kumar S, Abreu-Goodger C, Lear M, Harcus Y, Ceroni A, Babaya SA, Blaxter M, Ivens A,

Maizels RM. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. **Nat. Commun.** (2014);5.

Camussi G, Deregibus MG, Bruno S, Grange C, Vonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. **Am J Cancer Res.** (2011); 1(1): 98–110.

Cao JP, Shen FC, Luo XM, Cui CH, Lan YQ, Xu Y. Proton Conductivity Resulting from Different Triazole-Based Ligands in Two New Bifunctional Decavanadates. **RSC Adv.** (2018), 8, 18560– 18566.

Carter ER, Nabarro LE, Hedley L, Chiodini PL. Nitroimidazole-Refractory Giardiasis: a Growing Problem Requiring Rational Solutions. **Clin. Microbiol. Infect.** (2018), 24, 37–42.

Catalano M, O’Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. **J. Extracell. Vesicles** (2020), 9, 1, 1703244, DOI: 10.1080/20013078.2019.1703244

Cernikova L, Faso C, Adrian BH. Five facts about *Giardia lamblia*. **PLoS Pathog.** 2018; 14(9).

Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI; Trypanosoma cruzi Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. **The Journal Of Immunology** (2012) 188(4), 1942-1952. doi.org/10.4049/jimmunol.1102053.

Chen SP, Wu GZ, Long DW, Liu YD. Preparation, Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan-Ca₃V₁₀O₂₈ Complex Membrane. **Carbohydr. Polym** (2006) 64, 92–97.

Cipriano MJ, Hajduk SL. Drivers of persistent infection: pathogen-induced extracellular vesicles. **Essays Biochem** (2018) 62 (2):135-147.

Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. **Trends Parasitol.** 2015;31(10):477-489.

Coakley G, McCaskill JL, Borger JG, Simbari F, Robertson E, Millar M, Harcus Y, McSorley HJ, Maizels RM, Buck AH. Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. **Cell Rep.** 2017; 19(8): 1545–1557.

Codrean A, Dumitrascu D, Codrean V, Tit D., Bungau S, Aleya S. Epidemiology of human giardiasis in Romania: A 14 years survey. **Sci. Total Environ** (2020) 705:135784

Correia I, Avecilla F, Marcao S, Costa Pessoa J. Structural Studies of Decavanadate Compounds with Organic Molecules and Inorganic Ions in Their Crystal Packing. **Inorg. Chim. Acta** (2004), 357, 4476–4487.

Cotton JA, Amat CB, Buret AG. Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. **Pathogens**. 2015 Dec; 4(4): 764–792.

Cotton JA, Bhargava A, Ferraz JG, Yates RM, Beck PL, Buret AG. Giardia duodenalis Cathepsin B Proteases Degrade Intestinal Epithelial Interleukin-8 and Attenuate Interleukin-8-Induced Neutrophil Chemotaxis (2014). **Infect Immun** 82 (7):2772-2787.

Croxford JL, Wang K, Miller SD, Engman DM, Tyler KM. Effects of cannabinoid treatment on Chagas disease pathogenesis: balancing inhibition of parasite invasion and immunosuppression. **Cell Microbiol**. 2005 7(11):1592-602.

Cwiklinski K, de la Torre-Escudero E, Trelis M, Bernal D, Dufresne PJ, Brennan GP, O'Neill S, Tort J, Paterson S, Marcilla A, Dalton JP, Robinson MW. The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis. **Mol Cell Proteomics**. 2015;14(12):3258-73.

Dorsey BM, McLauchlan CC, Jones MA. Evidence That Speciation of Oxovanadium Complexes Does Not Solely Account for Inhibition of Leishmania Acid Phosphatases. **Front. Chem.** (2018), 6, 109.

Embley TM, Hirt RP. Early branching eukaryotes? **Curr Opin Genet Dev** (1998);8(6):624-9.

Evans-Osses I, Mojoli A, Monguió-Tortajada M, Marcilla A, Aran V, Amorim M, Inal J, Borràs FE, Ramirez MI. Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. **Eur J Cell Biol**. 2017;96(2):131-142.

Evans-Osses I, Reichembach LH, Ramirez MI. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. **Parasitol Res** (2015);114(10):3567-75.

Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M, Borgui M, D'Ilio S, Lugini L, Violante N, Azzarito T, Majorani C, Brambilla D, Fais S. Exosome Release and Low pH Belong to a Framework of Resistance of Human Melanoma Cells to Cisplatin. **PLoS ONE** (2014) 9(2): e88193

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet.** (2008);9(2):102-14.

Fink MY, Singer SM. The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. **Trends Parasitol.** 2017;33(11):901-913.

Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hosotsubo H, Nakamori Y, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. **J Trauma.** 2002;52(3):443-8.

Galani A, Tsitsias V, Stellas D, Psycharis V, Raptopoulou CP, Karaliota A. Two Novel Compounds of Vanadium and Molybdenum with Carnitine Exhibiting Potential Pharmacological Use. **J. Inorg. Biochem** (2015), 142, 109–117.

Gao M, Chen M, Li C, Xu M, Liu Y, Cong M, Sang N, Liu S. Long non-coding RNA MT1DP shunts the cellular defense to cytotoxicity through crosstalk with MT1H and RhoC in cadmium stress. **Cell Discov.** (2018), 4(5).

Gavinho B, Rossi IV, Evans-Osses I, Inal J, Ramirez MI. A new landscape of host-protozoa interactions involving the extracellular vesicles world. **Parasitol.** (2018);145(12):1521-1530.

Goler-Baron V, Assaraf YG. Structure and function of ABCG2-rich extracellular vesicles mediating multidrug resistance. **PLoS One.** (2011) 24;6(1):e16007.

Gonçalves DS, Ferreira MS, Liedke SC, Gomes KX, Oliveira GA, Leão PEL, Cesar GV, Seabra SH, Cortines JR, Casadevall A, Nimrichter L, Domont GB, Junqueira MR, Peralta JM, Guimaraes AJ. Extracellular vesicles and vesicle-free secretome of the protozoa *Acanthamoeba castellanii* under homeostasis and nutritional stress and their damaging potential to host cells. **Virulence.** 2018; 9(1): 818–836.

Gorzsas A, Andersson I, Pettersson L. Speciation in Aqueous Vanadate-Ligand and Peroxovanadate-Ligand Systems. **J. Inorg. Biochem.** (2009), 103, 517–526.

Gottig N, Elías EV, Quiroga R, Nores MJ, Solari AJ, Touz MC, Luján HD. Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **J Biol Chem.** 2006 Jun 30;281(26):18156-66.

Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature** (2008);451(7177):414-6.

Gutiérrez MJ, Aldasoro E, Requena A, Comin AM, Pinazo MJ, Bardají A, Oliveira I, Valls ME, Gascon J. Refractory giardiasis in Spanish travellers. **Travel Med Infect Dis** (2013) 11(2):126-9

Gutierrez-Gutierrez F, Puebla-Perez AM Gonzalez-Pozos S, Hernandez-Hernandez JM, Perez-Rangel A, Alvarez LP, Tapia-Pastrana G, Castillo-Romero A. Antigiardial Activity of Podophyllotoxin-Type Lignans from *Bursera fagaroides* var. **Molecules** (2017), 22, 799.

György B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2006, V.38, pp. 1662-1677.

Hagen KD, McInally SG, Hilton ND, Dawson SC. Chapter Two – Microtubule organelles in *Giardia*. **Adv Parasit** 2020, V.107, pp.25-96.

Halliez MCM, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World J Gastroenterol.** 2013; 19(47): 8974–8985.

Hardcastle FD, Wachs IE. Determination of Vanadium Oxygen Bond Distances and Bond Orders by Raman Spectroscopy. **J.Phys. Chem** (1991), 95, 5031–5041.

Hernández-Cervantes R, Méndez-Díaz M, Prospéro-García Ó, Morales-Montor J. (2017). Immunoregulatory Role of Cannabinoids during Infectious Disease. **Neuroimmunomodulation.** 2017;24(4-5):183-199.

Hashimoto T, Sánchez LB, Shirakura T, Müller M, Hasegawa M. Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. **PNAS** (1998); 95 (12) 6860-6865.

Hoffman PS, Sisson G, Croxen MA, Welch K, Harman WD, Cremades N, Morash MG. Antiparasitic Drug Nitazoxanide Inhibits the Pyruvate Oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, Selected Anaerobic Bacteria and Parasites, and *Campylobacter jejuni*. **Antimicrob Agents Chemother** (2007), 51(3): 868–876.

Ifergan I, Scheffer GL, Assaraf YG. Novel extracellular vesicles mediate an ABCG2-dependent anticancer drug sequestration and resistance. **Cancer Res.** (2005) 1;65(23):10952-8.

Jeffrey CJ. Protein moonlighting: what is it, and why is it important? **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** 2018, 373 (1738)

Jimenez L, Yu H, McKenzie AJ, Franklin JL, Patton JG, Liu Q, Weaver AM. Quantitative Proteomic Analysis of Small and Large Extracellular Vesicles (EVs) Reveals Enrichment of Adhesion Proteins in Small EVs (2019) **J. Proteome Res** doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00647.

Jones J, Causey C, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): current understanding and future therapeutic potential. **Curr Opin Drug Discov Devel.** (2009); 12(5): 616–627.

Jorfi S, Ansa-Addo EA, Kholia S, Stratton D, Valley S, Lange S, Inal J. Inhibition of Microvesiculation Sensitizes Prostate Cancer Cells to Chemotherapy and Reduces Docetaxel Dose Required to Limit Tumor Growth in Vivo. **Sci Rep.** 2015 5:13006.

Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang CS, Mechler A, Simpson RJ, Hulett MD, Mathivanan S. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. **Proteomics.** 2013 13(22):3354-64.

Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1983, 77: 487–488

Kempf JY, Rohmer MM, Poblet JM, Bo C, Benard M. Relative Basicities of the Oxygen Sites in [V10O28]⁶⁻. An Analysis of the Ab Initio Determined Distributions of the Electrostatic Potential and of the Laplacian of Charge Density. **J. Am. Chem. Soc.** (1992), 114, 1136–1146.

Kholia S, Jorfi S, Thompson PR, Causey CP, Nicholas AP, Inal JM, Lange S. A Novel Role for Peptidylarginine Deiminases in Microvesicle Release Reveals Therapeutic Potential of PAD Inhibition in Sensitizing Prostate Cancer Cells to Chemotherapy (2015). **J Extracell Vesicles**, 4:26192. doi: 10.3402/jev.v4.26192.

Kioseoglou E, Gabriel C, Petanidis S, Psycharis V, Raptopoulou CP, Terzis A, Salifoglou A. Binary DecavanadateBetaine Composite Materials of Potential Anticarcinogenic Activity. **Z. Anorg. Allg. Chem.** (2013), 639, 1407–1416

Kioseoglou E, Gabriel C, Petanidis S, Psycharis V, Raptopoulou CP, Terzis A, Salifoglou A. Binary DecavanadateBetaine Composite Materials of Potential Anticarcinogenic Activity. **Z. Anorg. Allg. Chem.** (2013), 639, 1407–1416.

Koh WH, Geurden T, Paget T, O'Handley R, Steuart RF, Thompson RCA, Buret AG. *Giardia duodenalis* Assemblage-Specific Induction of Apoptosis and Tight

Junction Disruption in Human Intestinal Epithelial Cells: Effects of Mixed Infections. **J Parasitol** (2013) 99 (2): 353–358.

Kosgodage US, Matewele P, Awamaria B, Kraev I, Warde P, Mastroianni G, Nunn AV, Guy GW, Bell JD, Inal JM, Lange S. Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. **Front Cell Infect Microbiol**. 2019c 9:324.

Kosgodage US, Matewele P, Mastroianni G, Kraev I, Brotherton D, Awamaria B, Nicholas AP, Lange S, Inal JM. Peptidylarginine Deiminase Inhibitors Reduce Bacterial Membrane Vesicle Release and Sensitize Bacteria to Antibiotic Treatment. **Front Cell Infect Microbiol**. 2019a 9:227.

Kosgodage US, Mould R, Henley AB, Nunn AV, Guy GW, Thomas EL, Inal JM, Bell JD, Lange S. Cannabidiol (CBD) Is a Novel Inhibitor for Exosome and Microvesicle (EMV) Release in Cancer. **Front Pharmacol**. 2018b; 9:889.

Kosgodage US, Trindade RP, Thompson PR, Inal JM, Lange S. Chloramidine/Bisindolylmaleimide-I-Mediated Inhibition of Exosome and Microvesicle Release and Enhanced Efficacy of Cancer Chemotherapy. **Int J Mol Sci**. 2017; 18(5): 1007.

Kosgodage US, Uysal-Onganer P, MacLatchy A, Mould R, Nunn AV, Guy GW, Kraev I, Chatterton NP, Thomas EL, Inal JM, Bell JD, Lange S. Cannabidiol Affects Extracellular Vesicle Release, miR21 and miR126, and Reduces Prohibitin Protein in Glioblastoma Multiforme Cells. **Transl Oncol**. 2019b; 12(3):513-522.

Kosgodage, US, Uysal-Onganer P, MacLatchy A, Nicholas AP, Inal JM, Lange S. Peptidylarginine Deiminases Post-translationally deiminate Prohibitin and modulate Extracellular Vesicle Release and microRNAs in Glioblastoma Multiforme. **Int J Mol Sci** 2018a; 20(1):103.

Lalle M, Hanevik K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. **Infect Drug Resist** (2018) 11: 1921–1933.

Lange S, Gallagher M, Kholia S, Kosgodage US, Hristova M, Hardy J, Inal JM. Peptidylarginine Deiminases-Roles in Cancer and Neurodegeneration and Possible Avenues for Therapeutic Intervention via Modulation of Exosome and Microvesicle (EMV) Release? **Int J Mol Sci**. 2017;18(6). pii: E1196.

Leitsch D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. **Curr Trop Med Rep**

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell.** (2005);120(1):15-20.

Lewis H, Natch M. iPAD or PADi-'tablets' with therapeutic disease potential? **Curr Opin Chem Biol.** (2016);33:169-78.

Levina A, Lay PA. Stabilities and Biological Activities of Vanadium Drugs: What is the Nature of the Active Species? **Chem. Asian J** (2017) V12, I.14: 1692-1699.

Li P, Yao H, Zhang Z, Li M, Luo Y, Thompson PR, Gilmour DS, Wang Y. Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4. **Mol Cell Biol.** (2008); 28(15):4745–4758.

Li Y; Zhu C, Wu,Y, Jiang M.Yan CW. Synthesis, Crystal Structures and Anticancer Activities of Two Decavanadate Compounds. **Transition Met. Chem.** (2010) 35, 597– 603.

Liu J, Ma'ayeh S, Peirasmaki D, Lundström-Stadelmann B, Hellman L, Svärd SG. Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. **Virulence.** 2018; 9(1): 879–894.

Liu J, Zhu L, Wang J, Qiu L, Chen Y, Davis RE, Cheng G. Schistosoma japonicum extracellular vesicle miRNA cargo regulates host macrophage functions facilitating parasitism. **PLoS Pathog.** (2019);15(6):e1007817.

Luo Y, Arita K, Bhatia M, Knuckley B, Lee YH, Stallcup MR, Thompson PR. Inhibitors and Inactivators of Protein Arginine Deiminase 4: Functional and structural characterization. **Biochem.** (2006) ;45:11727–11736.

Ma'ayeh SY, Knör L, Svärd, S. Transcriptional profiling of *Giardia intestinalis* in response to oxidative stress. **Int. J. Parasitol** 2015 V.45, pp.925-938.

Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. **Trends Cell Biol.** 2017 Mar;27(3):172-188.

Ma'ayeh SY, Liu J, Peirasmaki D, Hörnaeus K, Bergström Lind S, Grabherr M, Bergquist J, Svärd SG. Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017;11(12):e0006120.

Macchiaroli N, Maldonado LL, Zarowiecki M, Cucher M, Gismondi MI, Kamenetzky L, Rosenzvit MC. Genome-wide identification of microRNA targets in the

neglected disease pathogens of the genus *Echinococcus*. **Mol Biochem Parasitol.** (2017);214:91-100.

Magnadottir B, Hayes P, Hristova M, Bragason B Th, Nicholas AP, Dodds AW, Gudmundsdottir S, Lange S. Post-translational protein deimination in cod (*Gadus morhua* L.) ontogeny – novel roles in tissue remodelling and mucosal immune defences? **Dev. Comp. Immunol.** 2018; 87:157-170

Manko A, Motta JP, Cotton JA, Feener T, Oyeyemi A, Vallence BA, Wallace JL, Buret AG. *Giardia* co-infection promotes the secretion of antimicrobial peptides beta-defensin 2 and trefoil factor 3 and attenuates attaching and effacing bacteria-induced intestinal disease. **PLoS One.** (2017); 12(6): e0178647

Mantel P, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, Ghiran I, Toner M, Irimia D, Ivanov AR, Barteneva N, Marti M. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. **Cell Host Microbe** (2013) 13, 521–534.

Martinez-Espinosa R, Argüello-García R, Saavedra A, Ortega-Pierres G. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. **Front Microbiol** (2015) 6: 800.

Mastronicola D, Falabella M, Forte E, Testa F, Sarti P, Giuffrè A. Antioxidant defence systems in the protozoan pathogen *Giardia intestinalis*. **Mol Biochem Parasitol.** (2016);206(1-2):56-66.

Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. **Nat. Cell. Biol** (2019), 21: 9-17.

McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle.** 2014;13(9):1400-12.

Mechoulam, R., Parker, L. A., and Gallily, R. (2002). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. **J. Clin. Pharmacol.** 42: 11S–19S.

Midlej V, de Souza W, Benchimol M. The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. **J Struct Biol.** (2019) 1;207(3):301-311.

Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M. The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. **J. Struct. Biol.** 2019. 207:301.

Missina, J.M., Gavinho, B., Postal, K., Santana, F.S., Valdameri, G., de Souza, E.M., Hughes, D.L., Ramirez, M.I., Soares, J.F., Nunes, G.G. Effects of Decavanadate Salts With Organic and Inorganic Cations on Escherichia Coli, Giardia Intestinalis, and Vero Cells. **Inorg Chem** 2018 Oct 1;57(19):11930-11941.

Morrison EE, Bailey MA, Dear JW. Renal extracellular vesicles: from physiology to clinical application. **J Physiol.** 2016 594(20):5735-5748.

Moyano, S., Musso, J., Feliziani, C., Zamponi, N., Frontera, L.S., Ropolo, A.S., Lanfredi-Rangel, A., Lalle, M., Touz, M.C. Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite *Giardia lamblia*: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk. **Cells.** 2019 8, 1600. doi:10.3390/cells8121600.

Müller J, Müller N. Nitroreductases of bacterial origin in *Giardia lamblia*: Potential role in detoxification of xenobiotics. **Microl Open** (2019); 8 (10) 10.1002/mbo3.904

Nantakomol D, Dondorp AM, Krudsood A, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Combes V, Grau GE, White NJ, Viriyavejakul P, Day NPJ, Chotivanich K. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. **J Infect Dis** (2011);203(5):700-6.

Nash TE, Ohi CA, Thomas E, Subramanian G, Keiser P, Moore TA. Treatment of patients with refractory giardiasis. **Clin Infect Dis** (2001) ,33(1):22-8.

Nawaz M, Fatima F, Vallabhaneni KC, Penfornis P, Valadi H, Ekström K, Kholia S, Whitt JD, Fernandes JD, Pochampally R, Squire JA, Camussi G. Extracellular vesicles:evolving factors in Stem Cell Biology. **Stem Cells Int.** 2016: 1073140.

Nawaz M, Fatima F. Extracellular vesicles, tunneling nanotubes, and cellular interplay: synergies and missing links. **Front Mol Biosci.** 2017: 4(50): 1-12.

Nok AJ, Ibrahim S, Arowosafe S, Longdet I, Ambrose A, Onyenekwe PC, Whong CZ. The trypanocidal effect of Cannabis sativa constituents in experimental animal trypanosomiasis. **Vet Hum Toxicol.** 1994; 36(6):522-4.

Nosala C, Hagen KD, Dawson SC. 'Disc-o-Fever': Getting Down with *Giardia*'s Groovy Microtubule Organelle. **Trends Parasitol** 2018 28 (2): 99-112.

Pacigova S, Rakovsky E, Sivak M, Zak Z. Hexakis[3-(aminocarbonyl)pyridinium] Decavanadate(V) Dihydrate. **Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.** (2007), 63, m419–m422.

Pessoa JC, Etcheverry S, Gambino, D. Vanadium Compounds in Medicine. **Coord. Chem. Rev.** (2015), 301–302, 24–48.

Pettersson L, Hedman B, Andersson I, Ingri, N. Multicomponent Polyanions 34. A Potentiometric and V-51 NMR Study of Equilibria in the $H^+ -HVO_4^{2-}$ System in 0.6 M NaCl Medium Covering the Range $1 \leq [H^+] \leq 10$. **Chem. Scripta** (1983), 22, 254–264.

Pope SM, Lasser C. Toxoplasma gondii infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. **J Extracell Vesicles.** (2013); 2: 10.3402/jev.v2i0.22484

Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elías EV, Rivero FD, Saura A, Carranza PG, Luján HD. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. **Nature.** 2008;456(7223):750-4.

Ramirez MI, Amorim MG, Gadelha C, Milic I, Welsh JA, Freitas VM, Nawaz M, Akbar N, Couch Y, Makin L, Cooke F, Vettore AL, Batista PX, Freezor R, Pezuk JA, Rosa-Fernandes L, Carreira ACO, Devitt A, Jacobs L, Silva IT, Coakley G, Nunes DN, Carter D, Palmisano G, Dias-Neto E. Technical challenges of working with extracellular vesicles. **Nanoscale.** 2018;10(3):881-906.

Rehder D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. **Inorganica Chim. Acta** (2020) V. 504, 119445.

Revenfeld ALS, Baek R, Nielsen MH, Stensballe A, Varming K, Jorgensen M. Diagnostic and Prognostic Potential of Extracellular Vesicles in Peripheral Blood. **Clin. Ther** (2014) V.36 I.6, p.830-846.

Roulette CJ, Kazanji M, Breurec S, Hagen EH. (2016). High prevalence of cannabis use among Aka foragers of the Congo Basin and its possible relationship to helminthiasis. **Am J Hum Biol.** 2016;28(1):5-15.

Ryu A, Kim DH, Kim E, Lee MY. The Potential Roles of Extracellular Vesicles in Cigarette Smoke-Associated Diseases. **Oxid Med Cell Longev.** 2018; 2018: 4692081.

Saha N, Dutta S, Datta SP, Sarkar S. The minimal ESCRT machinery of *Giardia lamblia* has altered inter-subunit interactions within the ESCRT-II and

ESCRT-III complexes. **Eur J Cell Biol.** 2018 Jan;97(1):44-62. doi: 10.1016/j.ejcb.2017.11.004.

Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, Illanes S.E, Mitchell M.D, Rice G.E. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. **Front Pharmacol.** 2014; 5: 175.

Sateriale A, Bessof K, Sarkar IN, Huston CD. Drug repurposing: mining protozoan proteomes for targets of known bioactive compounds. **J Am Med Inform Assoc** (2014) 21(2): 238–244.

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

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods.** 2012;9(7):671-5.

Serradell MC, Saura A, Rupil LL, Gargantini PR, Faya MI, Furlan PJ, Hugo, Lujan HD. Vaccination of domestic animals with a novel oral vaccine prevents *Giardia* infections, alleviates signs of giardiasis and reduces transmission to humans. **NPJ Vaccines.** 2016; 1: 16018.

Shah HS, Al-Oweini R, Haider A, Kortz U, Iqbal J. Cytotoxicity and Enzyme Inhibition Studies of Polyoxometalates and Their Chitosan Nanoassemblies. **Toxicol. Rep.** (2014), 1, 341–352.

Shahid M, Sharma PK, Anjuli Chibber S, Siddiqi ZA. Isolation of a Decavanadate Cluster [H₂V₁₀O₂₈][4-picH]·4·2H₂O (4- pic = 4-picoline): Crystal Structure, Electrochemical Characterization, Genotoxic and Antimicrobial Studies. **J. Cluster Sci** (2014) 25, 1435– 1447

Slomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Zekanowska E, Kornek M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? **Front Immunol.** 2018;9:2723.

Soldevilla B, Rodríguez M, Millán CS, García V, Fernández-Periañez R, Gil-Calderón B, Martín P, García-Grande A, Silva J, Bonilla F, Domínguez G. Tumor-derived exosomes are enriched in ΔNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. **Hum Mol Genet** (2014);23(2):467-78.

Song MS, Rossi JJ. Molecular Mechanisms of Dicer: Endonuclease and Enzymatic Activity. **Biochem. J.** (2017); 474:1603–1618.

Sork H, Corso G, Krjutskov K, Johansson HJ, Nordin JZ, Wiklander OPB, Lee YXF, Westholm JO, Lehtiö J, Wood MJA, Mäger I, El Andaloussi S. Heterogeneity and interplay of the extracellular vesicle small RNA transcriptome and proteome. **Sci Rep.** 2018;8(1):10813.

Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH. Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. **Trends Mol Med** (2015);21(10):595-608.

Stadelmann B, Hanevik K, Andersson MK, Bruserud O, Svärd SG. The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions in vitro. **BMC Microbiol.** 2013; 13:256.

Thompson RCA, Monis PT. Taxonomy of *Giardia species*. In: *Giardia* A model organism (2014). SpringerWienNewYork, p.3-12. ISBN 978-3-7091-0197-1.

Tkach M, Kowal J, Théry C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2018;373(1737). pii: 20160479.

Toumi S, Ratel-Ramond N, Akriche S. Decavanadate Cage-like Cluster Templated by Organic Counter Cation: Synthesis, Characterization and Its Antimicrobial Effect Against Gram Positive. **J. Cluster Sci** (2015) 26, 1821–1831.

Trejo-Soto PJ, Aguayo-Ortiz R, Yépez-Mulia L, Hernández-Campos A, Medina-Franco JL, Castillo R. Insights into the structure and inhibition of *Giardia intestinalis* arginine deiminase: homology modeling, docking, and molecular dynamics studies. **J Biomol Struct Dyn.** 2016;34(4):732-48.

Treviño S, Velazquez-Vazquez D, Sanchez-Lara E, DiazFonseca A, Flores-Hernandez J, Perez-Benitez A, Brambila Colombres E, Gonzalez-Vergara E. Metforminium Decavanadate as a Potential Metallopharmaceutical Drug for the Treatment of Diabetes Mellitus. **Oxid. Med. Cell. Longev.** (2016), 1–14.

Treviño S, Velazquez-Vazquez D, Sanchez-Lara E, Diaz Fonseca A, Flores-Hernandez J, Perez-Benitez A, Brambila Colombres E, Gonzalez-Vergara E, Metforminium Decavanadate as a Potential Metallopharmaceutical Drug for the Treatment of Diabetes Mellitus. **Oxid. Med. Cell. Longev** (2016) 1–14

Turner TL, Nguyen VH, McLauchlan CC, Dymon Z, Dorsey BM, Hooker JD, Jones MA. Inhibitory Effects of Decavanadate on Several Enzymes and *Leishmania tarentolae* In Vitro. **J. Inorg. Biochem** (2012) 108, 96–104.

Upcroft J, Upcroft P. My favorite cell: Giardia. **Bioessays** (1998) Mar;20(3):256-63.

Uysal-Onganer P, MacLatchy A, Mahmoud R, Kraev I, Thompson PR, Inal JM, Lange S. Peptidylarginine Deiminase Isozyme-Specific PAD2, PAD3 and PAD4 Inhibitors Differentially Modulate Extracellular Vesicle Signatures and Cell Invasion in Two Glioblastoma Multiforme Cell Lines. **Int J Mol Sci.** 2020 21(4). pii: E1495.

Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** 2016 Nov 15;106(Pt A):148-156.

Vagner T, Spinelli C, Minciocchi VR, Balaj L, Zandian M, Conley A, Zijlstra A, Freeman MR, Demichelis F, De S, Posadas EM, Tanaka H, Vizio DD. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. **J Extracell Vesicles.** 2018; 7(1): 1505403.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2018;19(4):213-228.

Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. **Bioessays.** 2003; 25 (11) :1106-1118.

Wampfler PB, Tosevski V, Nanni P, Spycher C, Hehl AB. Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. **PLoS One.** 2014 Apr 14;9(4):e94089.doi: 10.1371/journal.pone.0094089

Wang X. miRDB: A microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. **RNA.** (2008); 14(6): 1012–1017.

Wang S, Wang Y. Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. **Biochim. Biophys. Acta,** 2013; 1829(10):1126-1135.

Weiland MEL, McArthur AG, Morrison HG, Sogin ML, Svard SG. Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*. **Int. J. Parasitol.** 2005 V.35 (6), pp.617-626.

Weiland MEL, Palm JED, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svard SG. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. **Int. J. Parasitol.** 2003 V.33(12), pp.1341-1351.

Witalison EE, Thompson PR, Hofseth LJ. Protein arginine deiminases and associated citrullination: physiological functions and diseases associated with dysregulation. **Curr. Drug Targets**, 2015; 16 (7):700-710.

Woessner DJ, Dawson SC. The Giardia Median Body Protein Is a Ventral Disc Protein That Is Critical for Maintaining a Domed Disc Conformation During Attachment. **Eukaryot. Cell** (2012), 11, 292–301.

Wyllie MP, Ramirez MI. Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. **Pathog. Dis.** (2017) V.75, I.7.

Xavier CPR, Caires HR, Barbosa MAG, Bergantim R, Guimarães JE, Vasconcelos MH. The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance. **Cells** (2020) 9(5): 1141

Yu S, Zhao Z, Xu X, Li M, Li P. Characterization of three different types of extracellular vesicles and their impact on bacterial growth. **Food Chem**, 2019; 272: 372-378.

Zhang Y, Chen D, Tian H, Zhang B, Wen J. Genome-wide computational identification of microRNAs and their targets in the deep-branching eukaryote *Giardia lamblia*. **Comput Biol Chem.** (2009);33(5):391-6.

Zebish M, Krauss M, Schäfer P, Sträter N. Structures of *Legionella pneumophila* NTPDase1 in complex with polyoxometallates. **Acta Cryst.** (2014). D70, 1147-1154

Zimorski V, Mentel M, Tielens AGM, Martin WF, Energy metabolism in anaerobic eukaryotes and Earth's late oxygenation. **Free Radic Biol Med** (2019) 140:279-294

ANEXO I

Relação das proteínas identificadas nas VEs totais
>tr A8B1T3 A8B1T3_GIAIC Ribosomal protein L27 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8462 PE=4 SV=1
>tr A8B1Y1 A8B1Y1_GIAIC VSP OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_137740 PE=4 SV=1
>tr A8B2T1 A8B2T1_GIAIC Coiled-coil protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8610 PE=4 SV=1
>tr A8B348 A8B348_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6544 PE=4 SV=1
>tr A8B373 A8B373_GIAIC Rhodanese domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6752 PE=4 SV=1
>tr A8B3P9 A8B3P9_GIAIC Acyl-CoA synthetase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_86511 PE=4 SV=1
>tr A8B9A6 A8B9A6_GIAIC MFS domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_114777 PE=4 SV=1;>tr A8B8E9 A8B8E9_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6)
>tr A8B8M0 A8B8M0_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11342 PE=4 SV=1
>tr A8B8X5 A8B8X5_GIAIC p60 katanin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8389 PE=4 SV=1
>tr A8B966 A8B966_GIAIC 4-methyl-5-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9088 PE=4 SV=1
>tr A8B9H1 A8B9H1_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_12139 PE=4 SV=1
>tr A8B9L4 A8B9L4_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8560 PE=4 SV=1
>tr A8BB58 A8BB58_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_137739 PE=4 SV=1
>tr A8BC67 A8BC67_GIAIC Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17163 PE=3 SV=1
>tr A8BCS1 A8BCS1_GIAIC Spindle pole protein, putative OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_7031 PE=4 SV=1
>tr A8BH21 A8BH21_GIAIC Ser/Thr protein kinase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15410 PE=4 SV=1
>tr A8BI13 A8BI13_GIAIC Alpha-6 giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14551 PE=4 SV=1
>tr A8BK86 A8BK86_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10196 PE=4 SV=1
>tr A8BKJ8 A8BKJ8_GIAIC Polyadenylate-binding protein, putative OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_5942 PE=4 SV=1
>tr A8BL61 A8BL61_GIAIC Dynein light chain OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9848 PE=3 SV=1
>tr A8BM82 A8BM82_GIAIC Wos2 protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10429 PE=4 SV=1
>tr A8BNV2 A8BNV2_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_113284 PE=4 SV=1
>tr A8BPE3 A8BPE3_GIAIC 4-alpha-glucanotransferase, amylo-alpha-1,6-glucosidase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10885 PE=4 SV=1
>tr A8BPK1 A8BPK1_GIAIC Rac/Rho-like protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8496 PE=4 SV=1
>tr A8BPT2 A8BPT2_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17551 PE=4 SV=1
>tr A8BQ62 A8BQ62_GIAIC Putative_PNPOx domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_5810 PE=4 SV=1
>tr A8BQS7 A8BQS7_GIAIC Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_13864 PE=4 SV=1
>tr A8BS32 A8BS32_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_21201 PE=4 SV=1
>tr A8BS66 A8BS66_GIAIC Mitogen-activated protein kinase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_22850 PE=3 SV=1
>tr A8BS67 A8BS67_GIAIC Sjogrens syndrome nuclear autoantigen 1-like protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16263 PE=4 SV=1

>tr A8BSJ7 A8BSJ7_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_34653 PE=4 SV=1
>tr A8BT25 A8BT25_GIAIC Thioredoxin domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9355 PE=4 SV=1
>tr A8BTQ0 A8BTQ0_GIAIC Phospholipase B-like OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_93548 PE=3 SV=1
>tr A8BU80 A8BU80_GIAIC Peroxiredoxin 1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15383 PE=4 SV=1
>tr A8BVR8 A8BVR8_GIAIC NAC-A/B domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_5604 PE=4 SV=1
>tr A8BWM0 A8BWM0_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_35999 PE=4 SV=1
>tr A8BX22 A8BX22_GIAIC Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_27310 PE=4 SV=1
>tr E2RTP3 E2RTP3_GIAIC Alcohol dehydrogenase lateral transfer candidate OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_3593 PE=4 SV=1
>tr E2RTP4 E2RTP4_GIAIC Alpha-1 giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11654 PE=4 SV=1
>tr E2RTZ1 E2RTZ1_GIAIC Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_114609 PE=4 SV=1
>tr E2RTZ2 E2RTZ2_GIAIC Rab1a OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9558 PE=4 SV=1
>tr E2RU17 E2RU17_GIAIC Rab2a OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15567 PE=4 SV=1
>tr E2RU99 E2RU99_GIAIC Branched-chain amino acid aminotransferase lateral transfer candidate OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6184 PE=4 SV=1
>tr A8B3J7 A8B3J7_GIAIC Aldehyde-alcohol dehydrogenase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_93358 PE=3 SV=1
>tr A8B5K6 A8B5K6_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14859 PE=4 SV=1
>tr A8B6Z3 A8B6Z3_GIAIC WD-40 repeat protein family OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10822 PE=4 SV=1
>tr A8B8F8 A8B8F8_GIAIC Ribosomal protein L12 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14938 PE=3 SV=1
>tr A8BA49 A8BA49_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16507 PE=4 SV=1
>tr A8BBT5 A8BBT5_GIAIC Axoneme-associated protein GASP-180 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16745 PE=4 SV=1
>tr A8BDV4 A8BDV4_GIAIC FixW protein, putative OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6289 PE=4 SV=1
>tr A8BEJ1 A8BEJ1_GIAIC Aminoacyl-histidine dipeptidase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15832 PE=4 SV=1
>tr A8BER9 A8BER9_GIAIC Median body protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16343 PE=4 SV=1
>tr A8BH09 A8BH09_GIAIC Translation initiation inhibitor OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_480 PE=4 SV=1
>tr A8BH18 A8BH18_GIAIC Kinase, NEK OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11390 PE=4 SV=1
>tr A8BL06 A8BL06_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_7520 PE=4 SV=1
>tr A8BL74 A8BL74_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9861 PE=4 SV=1
>tr A8BNC0 A8BNC0_GIAIC Coiled-coil protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_113677 PE=4 SV=1
>tr A8BVD3 A8BVD3_GIAIC Transketolase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9704 PE=4 SV=1
>tr A8BYL1 A8BYL1_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_13584 PE=4 SV=1
>tr A8BZ22 A8BZ22_GIAIC Translation elongation factor OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_13561 PE=4 SV=1
>tr E2RTQ9 E2RTQ9_GIAIC Alpha-2 giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_7796 PE=4 SV=1
>tr E2RU75 E2RU75_GIAIC Giardia trophozoite antigen GTA-1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17090 PE=4 SV=1
>tr A8BEZ6 A8BEZ6_GIAIC Delta giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_86676 PE=4 SV=1

>tr A8BQ26 A8BQ26_GIAIC Pyruvate, phosphate dikinase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9909 PE=3 SV=1
>tr A8BXV9 A8BXV9_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9030 PE=4 SV=1
>tr A8BZ89 A8BZ89_GIAIC Eukaryotic translation initiation factor 5A OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14614 PE=3 SV=1
>tr E2RTN7 E2RTN7_GIAIC Gamma giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17230 PE=4 SV=1
>tr E2RU97 E2RU97_GIAIC 14-3-3 protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6430 PE=3 SV=1
>tr A8B440 A8B440_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_27925 PE=4 SV=1
>tr E2RTW4 E2RTW4_GIAIC Protein disulfide isomerase PDI5 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8064 PE=4 SV=1
>tr A8B431 A8B431_GIAIC Bip OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17121 PE=3 SV=1
>tr A8B820 A8B820_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17060 PE=4 SV=1
>tr A8BH19 A8BH19_GIAIC Kinase, NEK OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15409 PE=4 SV=1
>tr A8BGV6 A8BGV6_GIAIC Phosphoglycerate kinase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_90872 PE=3 SV=1
>tr E2RU95 E2RU95_GIAIC UPL-1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9779 PE=4 SV=1
>tr A8BCR6 A8BCR6_GIAIC Cytosolic HSP70 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_88765 PE=3 SV=1
>tr A8B4Z7 A8B4Z7_GIAIC Kinesin-3 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_102101 PE=3 SV=1;>tr A8B518 A8B518_GIAIC Kinesin-3 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_112846 PE=3 SV=1
>tr A8B6L8 A8B6L8_GIAIC 40S ribosomal protein S6 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14620 PE=3 SV=1
>tr A8B9C8 A8B9C8_GIAIC DNA-directed RNA polymerase subunit D OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10055 PE=4 SV=1
>tr A8BBU1 A8BBU1_GIAIC Diphthine synthase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_28666 PE=4 SV=1
>tr A8BCR1 A8BCR1_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_7021 PE=4 SV=1
>tr A8BEW2 A8BEW2_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9183 PE=4 SV=1
>tr A8BFE3 A8BFE3_GIAIC 40S ribosomal protein S4 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11359 PE=3 SV=1
>tr A8BIB1 A8BIB1_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_92602 PE=4 SV=1
>tr A8BR70 A8BR70_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6081 PE=4 SV=1
>tr A8BRA9 A8BRA9_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17379 PE=4 SV=1
>tr A8BU55 A8BU55_GIAIC Protein 21.1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17568 PE=4 SV=1
>tr A8BUY6 A8BUY6_GIAIC Lyase_8 domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15347 PE=4 SV=1
>tr A8BYK7 A8BYK7_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_41212 PE=4 SV=1
>tr A8BZ58 A8BZ58_GIAIC Ribosomal protein S18 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15551 PE=3 SV=1
>tr A8BZD3 A8BZD3_GIAIC Ribosomal protein S5 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_12981 PE=4 SV=1
>tr D3KHQ0 D3KHQ0_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16922 PE=4 SV=1
>tr E2RU45 E2RU45_GIAIC Vacuolar protein sorting 35 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_23833 PE=4 SV=1
>tr A8B2W2 A8B2W2_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_22268 PE=4 SV=1
>tr A8B4Q1 A8B4Q1_GIAIC NOD3 protein, putative OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_4165 PE=4 SV=1

>tr A8B9T2 A8B9T2_GIAIC Kinase, NEK OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_97130 PE=4 SV=1
>tr A8BFN7 A8BFN7_GIAIC RNA-dependent helicase p68, putative OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17497 PE=4 SV=1
>tr A8BJ08 A8BJ08_GIAIC Ubiquitin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_7110 PE=4 SV=1
>tr A8BKB3 A8BKB3_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10182 PE=4 SV=1
>tr A8BKF1 A8BKF1_GIAIC Ribosomal protein P1B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17337 PE=3 SV=1
>tr A8BKK9 A8BKK9_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_37517 PE=4 SV=1
>tr A8BKZ3 A8BKZ3_GIAIC ZZ-type domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_113625 PE=4 SV=1
>tr A8BLL7 A8BLL7_GIAIC Ribosomal protein L7a OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17244 PE=4 SV=1
>tr A8BMY2 A8BMY2_GIAIC VSP OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_102662 PE=4 SV=1
>tr A8BMZ1 A8BMZ1_GIAIC Ribosomal protein S2 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_8118 PE=3 SV=1
>tr A8BQM2 A8BQM2_GIAIC VSP OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11521 PE=4 SV=1
>tr A8BQZ7 A8BQZ7_GIAIC 40S ribosomal protein S26 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17364 PE=3 SV=1
>tr A8BS37 A8BS37_GIAIC Ribosomal protein L23 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10091 PE=3 SV=1
>tr A8BWS4 A8BWS4_GIAIC Spindle pole protein, putative OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_13372 PE=4 SV=1
>tr A8BY06 A8BY06_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16085 PE=4 SV=1
>tr D3KH69 D3KH69_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_7970 PE=4 SV=1
>tr E2RU65 E2RU65_GIAIC Malate dehydrogenase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_3331 PE=3 SV=1
>tr A8B5E9 A8B5E9_GIAIC Thioredoxin domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_3910 PE=4 SV=1;>tr A8B4C4 A8B4C4_GIAIC Thioredoxin domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 5
>tr A8BFR0 A8BFR0_GIAIC Elongation factor 1-gamma OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_12102 PE=4 SV=1
>tr A8BU59 A8BU59_GIAIC Elongation factor 2 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17570 PE=4 SV=1
>tr A8BVM3 A8BVM3_GIAIC Cathepsin B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16779 PE=3 SV=1
>tr A8BZ11 A8BZ11_GIAIC VSP with INR OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14586 PE=4 SV=1
>tr A8BCP0 A8BCP0_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16588 PE=4 SV=1
>tr A8BH24 A8BH24_GIAIC Kinase, NEK-frag OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_15411 PE=4 SV=1
>tr E2RU27 E2RU27_GIAIC Thioredoxin reductase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_9827 PE=1 SV=1
>tr A8B5G1 A8B5G1_GIAIC Axoneme-associated protein GASP-180 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_137716 PE=4 SV=1
>tr A8BK79 A8BK79_GIAIC Xaa-Pro dipeptidase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_17327 PE=3 SV=1
>tr A8BPC0 A8BPC0_GIAIC Tubulin alpha chain OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_103676 PE=3 SV=1
>tr E2RTU7 E2RTU7_GIAIC Beta-giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_4812 PE=4 SV=1
>tr A8B252 A8B252_GIAIC 40S ribosomal protein S8 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_5845 PE=3 SV=1
>tr A8BEI4 A8BEI4_GIAIC Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16768 PE=4 SV=1
>tr A8BTG7 A8BTG7_GIAIC Cathepsin B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14019 PE=3 SV=1

>tr D3KHS6 D3KHS6_GIAIC DHR-1 domain-containing protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_114201 PE=3 SV=1
>tr E2RU33 E2RU33_GIAIC Ribosomal protein L10a OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_1345 PE=4 SV=1
>tr A8BE38 A8BE38_GIAIC Malic enzyme OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14285 PE=4 SV=1
>tr A8B2U2 A8B2U2_GIAIC Fructose-bisphosphate aldolase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11043 PE=4 SV=1
>tr A8B338 A8B338_GIAIC Peroxiredoxin 1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_14521 PE=4 SV=1;>tr A8BYC4 A8BYC4_GIAIC Peroxiredoxin 1 OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16
>tr E2RTS6 E2RTS6_GIAIC Enolase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_11118 PE=3 SV=1
>tr A8BEI6 A8BEI6_GIAIC Tubulin beta chain OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_101291 PE=3 SV=1
>tr E2RU57 E2RU57_GIAIC Alpha-7.3 giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_114787 PE=4 SV=1;>tr E2RTW1 E2RTW1_GIAIC Alpha-7.2 giardin OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL508
>tr E2RU36 E2RU36_GIAIC Arginine deiminase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_112103 PE=4 SV=1
>tr A8BB85 A8BB85_GIAIC Carbamate kinase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16453 PE=1 SV=1
>tr A8BFF8 A8BFF8_GIAIC Glutamate dehydrogenase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_21942 PE=3 SV=1
>tr A8BVR3 A8BVR3_GIAIC Elongation factor 1-alpha OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_112304 PE=3 SV=1
>tr A8BSP4 A8BSP4_GIAIC Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_6687 PE=3 SV=1
>tr E2RTT6 E2RTT6_GIAIC Ornithine carbamoyltransferase OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_10311 PE=3 SV=1