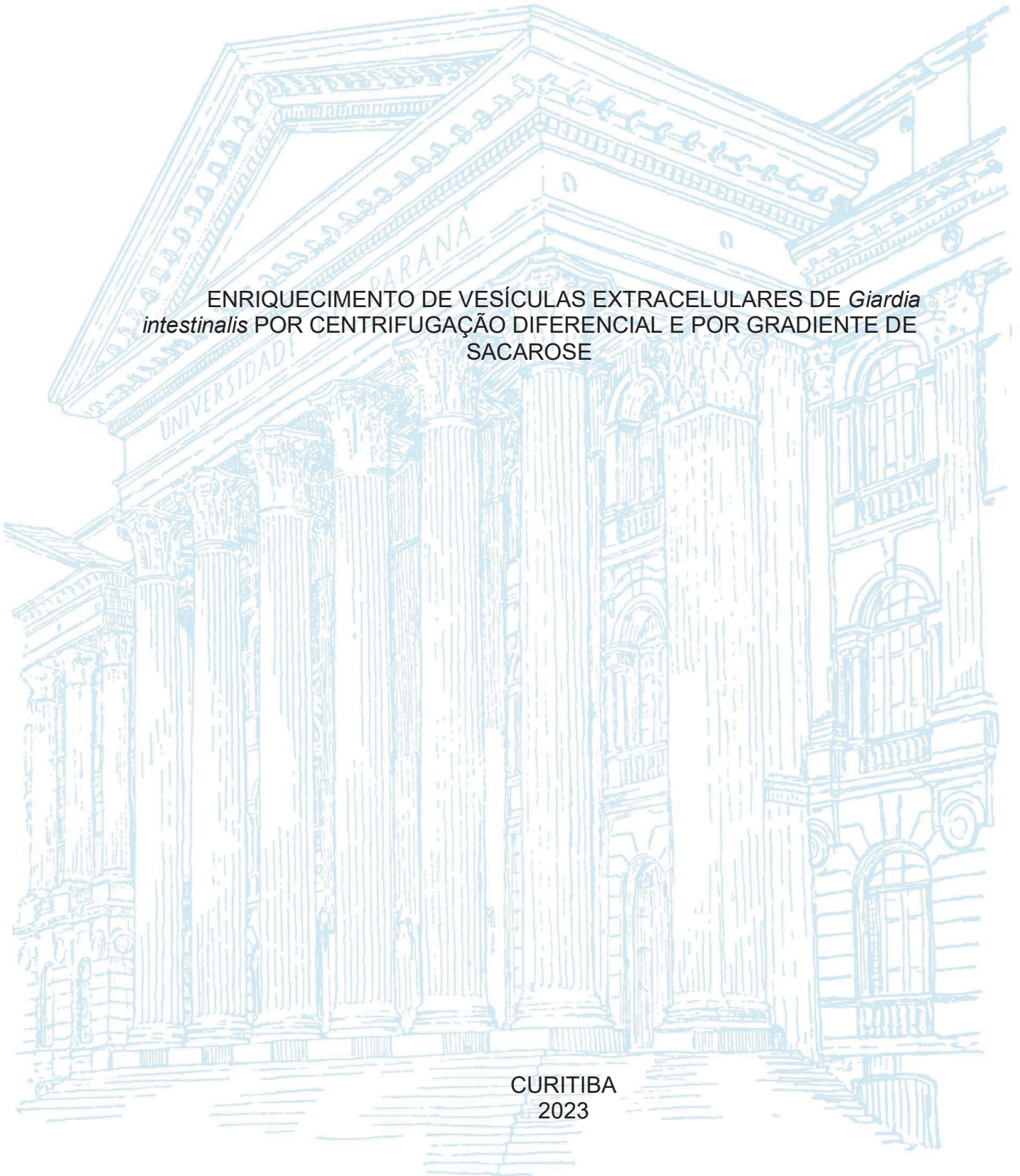


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ABEL SANA

ENRIQUECIMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Giardia*
intestinalis POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL E POR GRADIENTE DE
SACAROSE

CURITIBA
2023



ABEL SANA

ENRIQUECIMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Giardia intestinalis* POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL E POR GRADIENTE DE SACAROSE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

CURITIBA
2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sana, Abel

Enriquecimento de vesículas extracelulares de *Giardia intestinalis* por centrifugação diferencial / Abel Sana. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya.

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



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ABEL SANA** intitulada: **ENRIQUECIMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Giardia intestinalis* POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL E POR GRADIENTE DE SACAROSE**, 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 mestre 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, 30 de Novembro de 2023.

Assinatura Eletrônica

06/12/2023 10:40:06.0

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/12/2023 14:25:45.0

MAURO CORTEZ VÉLIZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

06/12/2023 11:47:43.0

GLAUCIO VALDAMERI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/12/2023 09:58:25.0

ALEJANDRO CORREA DOMINGUEZ
Avaliador Interno

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus pela vida, saúde e força que me concede a cada dia para trabalhar e chegar até aqui. Posso afirmar que “até aqui o Senhor me ajudou”.

Agradeço à minha esposa, Felismina Djedjo Sana. Sempre esteve presente, me apoiando em tudo. Ela é minha psicóloga, minha motivadora e minha âncora.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Marcel Ivan Ramirez, por ter acreditado em mim, mesmo não me conhecendo, me aceitou no grupo dele. O professor Marcel aceitou me orientar mesmo sabendo que eu não tinha nenhum contato com a pesquisa científica. Vale ressaltar que entrei no laboratório do professor Marcel sem saber pipetar bem e hoje posso dizer que sou capaz de seguir a minha jornada na busca pelo saber científico com mais confiança e com uma base sólida. Isso tem um significado enorme para mim, serei eternamente grato.

Agradeço às minhas colegas do grupo, Bruna Sabatke, Izadora Volpato Rossi e Letícia Bassani Bonato. Amigas, não tenho palavras para descrever o quanto estou feliz por ter compartilhado cada momento no grupo com vocês. Vocês sempre estiveram prontas para me auxiliarem no que fosse preciso, desde cultivo de células, produção e caracterização de vesículas até análise dos resultados. Bruna, se hoje estou escrevendo sobre *G. intestinalis*, isolamento e caracterização de VEs, saiba que foi você que tornou isso possível. Izadora, você me ajudou muito a crescer nesse pouco tempo que tivemos juntos. Embora o foco deste trabalho seja *G. intestinalis*, todo o conhecimento que você me passou sobre *T. cruzi* e células hospedeiras contribuíram para cada análise aqui feita. Letícia, você me ajudou com muitas ideias, sem esquecer da sua contribuição direta com uma das figuras do trabalho. Muito obrigado!

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, aos professores do programa por cada saber compartilhado. Foi uma honra ser discente dessa instituição.

Sou profundamente grato ao Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ Paraná pelo laboratório de cultivo de parasitas, equipamentos, refeitório, biblioteca, infraestrutura maravilhosa que tornou possível o desenvolvimento de cada resultado desse trabalho.

Ao CNPQ pelo fornecimento da bolsa de estudo que me permitiu trabalhar com tranquilidade e com dedicação exclusiva.

Ao povo brasileiro, cujo impostos sustentam a pesquisa, pela oportunidade de vir e estudar aqui no Brasil.

Muito obrigado a você que contribuiu de forma direta ou indireta para que eu pudesse chegar até aqui!

“É da natureza humana sermos curiosos a respeito de como vemos e ouvimos, do porquê de algumas coisas serem prazerosas, enquanto outras nos magoam, do modo como nos movemos, raciocinamos, aprendemos, lembramos e esquecemos, da natureza da raiva e da loucura”.

Bear, Mark F. pg. 4, 2017

RESUMO

Giardia intestinalis é um protozoário flagelado, causador da doença diarreica denominada giardíase. Recentemente a produção de vesículas extracelulares (VEs) por *G. intestinalis* e o papel dessas VEs na interação do parasito com o hospedeiro foi descrito. De acordo com a biogênese, as VEs são agrupadas em grandes (na sua maioria microvesículas) e pequenas (majoritariamente exossomos) e os dois grupos foram descritos em *G. Intestinalis*. As populações de VEs são heterogêneas e métodos aprimorados para separá-los e estudá-los são necessários para entender seus papéis na fisiologia e na patologia. Este trabalho objetivou-se em enriquecer e caracterizar as VEs de *G. intestinalis*, visando compreender melhor os papéis dessas vesículas na interação do parasito com o hospedeiro. Para isso, estabelecemos um método para enriquecer as VEs e as caracterizamos com base no tamanho por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). A produção de VEs foi induzida incubando *G. intestinalis* em meio TYI-S-33 sem soro, com 1mM de CaCl₂, por 1h a 37° C. As VEs foram isoladas do sobrenadante por centrifugação diferencial a 15K por 1 hora e 4 horas e pela ultracentrifugação diferencial a 100K por 1 hora e 30 minutos. Também as VEs foram isoladas por centrifugação diferencial a 15K 4h e separadas em frações por gradiente de sacarose. Como principal resultado, o NTA mostrou que a ultracentrifugação direta a 100K 1,5h e a 15K 4h concentraram mais VEs ($177,6 \times 10^8/\text{ml}$ e $165,4 \times 10^8/\text{ml}$, respectivamente) em comparação com a centrifugação a 15K 1h ($93,2 \times 10^8/\text{ml}$) e dessas VEs a maioria eram médias (mVEs) e grandes (IEVs). Quanto ao gradiente de sacarose, a fração 6 concentrou mais partículas ($148,8 \times 10^8/\text{ml}$) e eram na sua maioria VEs grandes (IEVs). Vimos que os VEs liberados por *G. intestinalis* podem ser melhor enriquecidas por ultracentrifugação a 100K 1,5h, ou por centrifugação 15K 4h. Este último pode ser feito utilizando uma centrífuga de bancada, o que pode ser útil para pesquisadores que desejam investigar o papel das VEs, mas não possuem uma ultracentrífuga. Espera-se que este trabalho possa auxiliar no estudo de VEs.

Palavras-chave: *G. intestinalis*; vesículas extracelulares; Enriquecimento; Caracterização

ABSTRACT

Giardia intestinalis is a flagellated protozoan that colonizes the small intestine causing the diarrheal disease called giardiasis. Recently, the production of extracellular vesicles (EVs) by *G. intestinalis* and the role of these EVs in the interaction between the parasite and the host was described. According to biogenesis, EVs are grouped into large (mostly microvesicles) and small (mostly exosomes) and both groups have been described in *G. intestinalis*. EVs populations are heterogeneous and improved methods to separate and study them are needed to understand their roles in physiology and pathology. This work aimed to enrich and characterize the EVs of *G. intestinalis*, aiming to better understand the roles of these vesicles in the interaction between the parasite and the host. To this end, we established a method to enrich EVs and characterized them based on size by nanoparticle tracking analysis (NTA). EV production was induced by incubating *G. intestinalis* in serum-free TYI-S-33 medium, with 1mM CaCl₂, for 1h at 37° C. EVs were isolated from the supernatant by differential centrifugation at 15K for 1 hour and 4 hours and by differential ultracentrifugation at 100K 1,5h. EVs were also isolated by differential centrifugation at 15K for 4h and separated into fractions by sucrose gradient. As a main result, the NTA showed that direct ultracentrifugation at 100K 1.5h and 15K 4h concentrated more EVs (177.6x10⁸/ml and 165.4x10⁸/ml, respectively) compared to centrifugation at 15K 1h (93.2x10⁸/ml) and of these VEs the majority were medium (mVEs) and large (IEVs). As for the sucrose gradient, fraction 6 concentrated more particles (148,8x10⁸/ml) and they were mostly large EVs (IEVs). We saw that EVs released by *G. intestinalis* can be enriched by direct ultracentrifugation at 100K 1,5h or by centrifugation at 15K 4h. The latter can be done using a benchtop centrifuge, which could be useful for researchers who want to investigate the role of EVs but do not have an ultracentrifuge. It is hoped that this work can assist in the study of EVs.

Keywords: *G. intestinalis*; Extracellular vesicles; Enrichment; Characterization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	CISTO, TROFOZOÍTO E CICLO DE VIDA DE <i>G. intestinalis</i>	16
FIGURA 2-	BIOGÊNESE DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS.....	21
FIGURA 3-	ESQUEMA DO PROTOCOLO USADO PARA ISOLAR VEs.....	29
FIGURA 4-	CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE <i>G. intestinalis</i>	32
FIGURA 5-	CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE CÉLULAS CACO-2.....	33
FIGURA 6-	CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE INTERAÇÃO <i>G. intestinalis</i> -Caco-2.....	34
FIGURA 7-	CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE <i>G. intestinalis</i> SOB pH ÁCIDO.....	35
FIGURA 8-	QUANTIFICAÇÃO DE VEs DE <i>G. intestinalis</i> ENRIQUECIDAS POR GRADIENTE DE SACAROSE.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

G. intestinalis – *Giardia intestinalis*

ILV – Vesícula intraluminal

IEVs – Vesículas Extracelulares grandes (large Extracellular Vesicles)

MVs – Microvesículas

NTA – Análise de Rastreamento de Nanopartículas

SAB – Soro Adulto Bovino

SFB – Soro Fetal Bovino

sEVs – Vesículas Extracelulares pequenas (small Extracellular Vesicles)

VEs – Vesículas extracelulares

VSPs – Proteínas de superfície específicas de variantes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>Giardia intestinalis</i>	15
2.2 <i>G. intestinalis</i> e Giardíase.....	17
2.3 Vesículas Extracelulares (VEs).....	19
2.3.1 Biogênese de VEs.....	19
2.3.2 VEs na Comunicação Celular.....	21
2.3.3 Isolamento e Caracterização de VEs.....	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Cultivo de células e parasitas.....	27
4.2. Isolamento de VEs de <i>G. intestinalis</i> , células Caco-2 e de interação <i>G. intestinalis</i> -Caco-2.....	27
4.3. Isolamento de VEs de <i>G. intestinalis</i> em pH ácido.....	28
4.4 Isolamento de VEs de <i>G. intestinalis</i> em gradiente de sacarose.....	28
4.5. Caracterização de VEs.....	29
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	29
4.7. Análise Estatística.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Enriquecimento e Caracterização de VEs de <i>G. intestinalis</i> e células Caco-2 por centrifugação diferencial.....	31
5.2 Enriquecimento e Caracterização de VEs de interação <i>G. intestinalis</i> -Caco	33
5.3 Indução da liberação de VEs de <i>G. intestinalis</i> em pH ácido.....	34
5.4 Enriquecimento de VEs de <i>G. intestinalis</i> por gradiente de sacarose.....	35
6. DISCUSSÃO	37
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Giardia intestinalis é um protozoário unicelular flagelado com distribuição cosmopolita (EVANS-OSES et al., 2010; ROJAS-LÓPEZ et al., 2022). O parasito pertence a ordem Diplomonadida (REY, 2008). No hospedeiro a *G. intestinalis* se localiza no intestino delgado onde prolifera extracelularmente causando a giardíase (CERNIKOVA et al, 2018). A giardíase é apontada como uma das doenças diarreicas mais frequentes no mundo, com uma incidência de 280 milhões de casos estimados anualmente (FINK et al, 2020). O tratamento da doença em humanos é à base de fármacos antiprotozoários, como tinidazol, metronidazol albendazol e por anti-helmínticos, como, por exemplo, albendazol e mebendazol (CERNIKOVA et al, 2018; KULAKOVA et al, 2014).

Devido à ausência de um tratamento eficaz contra *G. intestinalis* (Kulakova et al, 2014), vem ganhando o espaço a busca por alvos importantes na interação do parasito com as células hospedeiras e que podem abrir caminhos para o melhor entendimento dessa interação e o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Dentre esses alvos estão as vesículas extracelulares (VEs). As VEs são estruturas membranosas produzidas por diversos tipos celulares, incluindo patógenos. Essas partículas são classificadas por tamanho e biogênese em exossomos e microvesículas (MVs) (KARAM et al., 2022). As VEs atuam na comunicação celular entregando suas cargas para células receptoras resultando nas alterações fenotípicas que podem afetar o estado fisiológico dessas células (NIEL et al., 2018).

A produção de VEs por *G. intestinalis* e o papel dessas VEs na interação do parasito com o hospedeiro já foram descritos. Gavinho et al (2020) descreveu duas populações de VEs produzidas por *G. intestinalis*, as vesículas extracelulares maiores (IEVs > 100 nm), na sua maioria microvesículas (MVs) e as vesículas extracelulares menores (sEVs < 100 nm), constituídas principalmente por exossomos. Kim et al (2022) mostraram que as VEs de *Giardia* reduzem o encurtamento de colón na colite induzida por sulfato de dextrana (DSS). Também foi mostrado por Evans-Osses et al (2017) que as VEs produzidas por *G. intestinalis* são capazes de aumentar a adesão de forma trofozoíta desse parasito à superfície de células Caco-2.

As populações de VEs são heterogêneas e métodos aprimorados para enriquecê-las, separá-las e caracterizá-las são necessários para entender seus papéis na comunicação parasito-parasito e parasito-hospedeiro. O enriquecimento e purificação de VEs não são fáceis de realizar, e isso é evidenciado por diferenças nos protocolos de isolamento baseados na centrifugação diferencial utilizados por diferentes grupos (Moosavi et al, 2020; Muralidharan-CHari et al, 2009; Menck et al, 2013; Nievas et al,

2017; Gavinho et al, 2020). Por vezes, podem existir populações não representativas de vesículas grandes ou pequenas nas amostras em estudo, o que pode atrapalhar a compreensão dos fenómenos em análise.

Devido ao papel de VEs na interação de *G. intestinalis* com as células hospedeiras, este trabalho teve como objetivo definir uma metodologia baseada na centrifugação diferencial para enriquecer e separar melhor estas partículas a fim de compreender melhor o seu papel na interação do parasito com o hospedeiro.

Neste estudo, comparamos os diferentes tempos de centrifugação diferencial para obter um melhor enriquecimento de VEs no modelo de *G. intestinalis*. Também enriquecemos subpopulações de VEs por centrifugação em gradiente de sacarose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis, também chamada *Giardia duodenalis* ou *Giardia lamblia*, é um protozoário flagelado, anaeróbico, microaerófilo com capacidade de infectar e colonizar o intestino delgado dos humanos (ADAM, 2001). Há outras espécies de *Giardia*, como *Giardia agilis*, *Giardia ardeae*, *Giardia muris*, *Giardia microti* e *Giardia psittaci*. Porém, quanto à gama de hospedeiros, a *G. intestinalis* apresenta uma gama mais ampla em comparação às outras espécies e também possui maior importância para saúde pública. Os termos *Giardia intestinalis* e *Giardia duodenalis* são frequentemente usados para se referir às espécies de *Giardia* que infectam a maioria dos mamíferos, incluindo humanos e seus animais de estimação (FENG e XIAO, 2011).

A *G. intestinalis* é dividido em 8 conjuntos genéticos (A – H), sendo que os conjuntos A e B são os mais pertinentes para a saúde humana (FINK et al, 2020), apresentam ampla especificidade do hospedeiro e infectam não somente humanos, mas também vários outros mamíferos (THOMPSON et al, 2008).

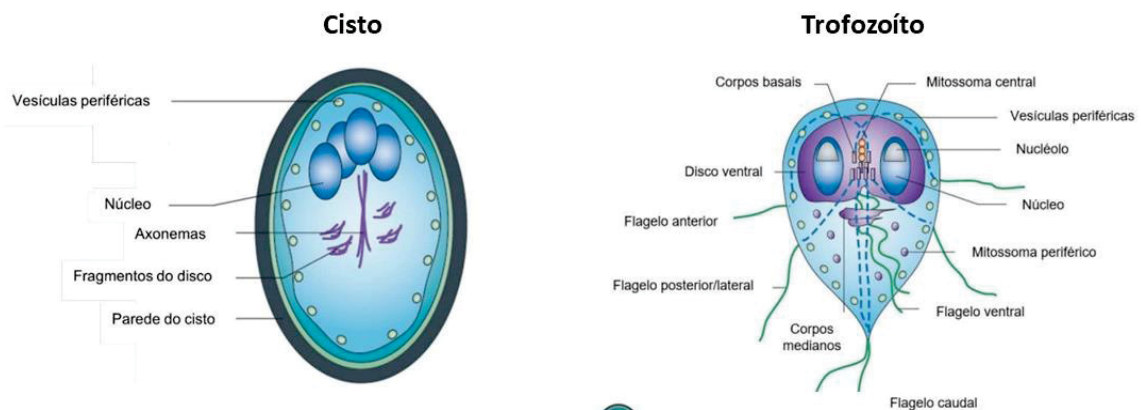
Quanto à sua biologia, *G. Intestinalis* possui um aparelho de Golgi e retículo endoplasmático atípicos, mitocôndrias diferenciadas chamadas mitossomas e vacúolos periféricos (PVs), apesar de ser altamente desenvolvido (GILLIN et al, 1996; ADAM, 2001; CERNIKOVA et al, 2018). Os PVs são organelas especializadas que atuam principalmente na endocitose do material extracelular em fase fluida e expõem substâncias nocivas ou inutilizáveis para o meio ambiente. Possuem características de endossomo precoce e tardio e até mesmo de lisossomos. A endocitose por meio de PVs é provavelmente a principal via de absorção de nutrientes utilizada pela *G. intestinalis* (CERNIKOVA et al, 2018). Alguns PVs formam vesículas semelhantes a exossomos que são liberadas, como evidenciado pelo enriquecimento de proteínas de PVs, como a gQa1 e a cisteína protease específica de encistamento nas frações exossomais de EVs de trofozoítos (MOYANO et al., 2019). O parasito apresenta dois estágios ao longo do seu ciclo de vida: cisto (infeccioso, resistente a condições do meio ambiente) e o estágio replicativo não invasivo, o trofozoíto, que é responsável pelas manifestações clínicas da doença (ADAM, 2001; FINK et al, 2020).

Os trofozoítos exibem uma forma piriforme, com corpo arredondado na região anterior e afilado na região posterior, com 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. Apresentam um disco ventral, quatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral) e dois núcleos, desprovidos de nucléolos, localizados na região anterior. Os flagelos iniciam em dois conjuntos de corpos basais localizados próximos à linha média. No citoplasma se encontram grânulos ribossômicos e de glicogênio e também vacúolos lisossômicos (ADAM, 2001; ANKARKLEV et al., 2010; SABATKE,

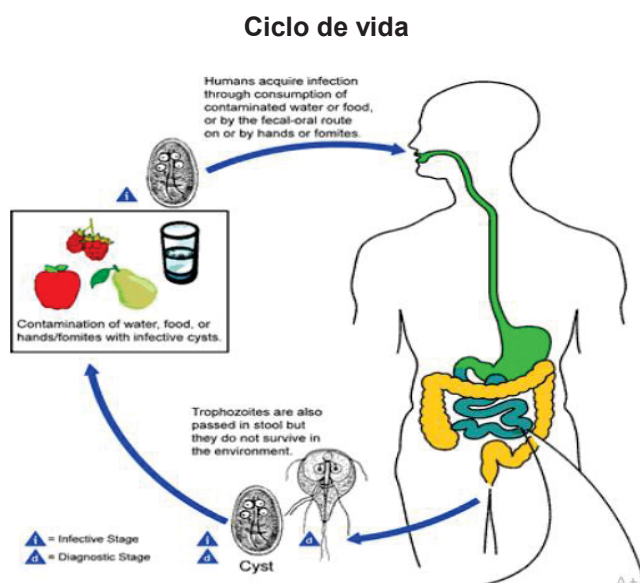
2021). Diferentemente dos trofozoítos, os cistos contêm quatro núcleos, isso porque o encistamento ocorre no intervalo entre a divisão nuclear e a citocinese. Apresentam uma estrutura oval com 5 por 7 a 10 μm de diâmetro e a sua parede é de 0,3 a 0,5 μm de espessura, composta por duas camadas: interna e externa (ADAM, 2001; Erlandsen et al, 1989).

O hospedeiro pode se infectar pela ingestão de água e alimentos contaminados com cistos ou por contato fecal-oral direto. A exposição dos cistos ao ambiente ácido do estômago induz o excistamento, através da quebra da parede do cisto, permitindo que os trofozoítos se depositem no intestino delgado proximal. A exposição de trofozoítos à biliar no jejuno faz com que comecem a encistar adquirindo a forma cística (ADAM, 2001). No começo desse longo processo de diferenciação, a internalização dos flagelos de trofozoítos se inicia, o disco adesivo se fragmenta e os trofozoítos encistados perdem a capacidade de adesão ao epitélio intestinal (ANKARKLEV et al., 2010). Os cistos são eliminados nas fezes, podendo reinfectar hospedeiros e retomar o ciclo (ADAM, 2001). Os trofozoítos habitam no duodeno e se replicam extracelularmente por fissão binária causando uma doença diarreica conhecida como giardíase (CERNIKOVA et al, 2018).

FIGURA 1. CISTO, TROFOZOÍTO E CICLO DE VIDA DE *G. intestinalis*



FONTE: Sabatke (2021), adaptado de Ankarklev et al. (2010)



FONTE: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) - <http://www.cve.saude.sp.gov.br>

2.2 *G. intestinalis* e Giardíase

A giardíase é apontada como uma das doenças diarreicas mais frequentes no mundo, com uma incidência de 280 milhões de casos estimados anualmente (FINK et al, 2020). Geralmente é uma doença clínica autolimitada caracterizada por diarreia, distensão abdominal, cólicas abdominais, má absorção e perda de peso; também há ocorrência frequente de giardíase assintomática, principalmente nos países em desenvolvimento (FENG e XIAO, 2011). O retardo do crescimento do parasito pode, a longo prazo, resultar na giardíase crônica (ADAM, 2001). Para Feng e Xiao (2011), além da infecção em humanos, a *G. intestinalis* causa giardíase em muitos mamíferos, o que faz com que a giardíase seja considerada uma doença zoonótica. Também é uma doença considerada multifatorial, onde várias alterações fisiológicas provocadas pelos trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal do hospedeiro podem levar ao seu estabelecimento (EINARSSON et al, 2016).

Devido à elevada prevalência, carga da infecção, propensão em causar grandes surtos, e aos efeitos no crescimento e nas funções cognitivas das crianças infectadas, a giardíase apresenta uma importância significativa para a saúde pública. Também é de importância veterinária por ser comum em animais de companhia e rebanhos (FENG e XIAO, 2011).

Nos países desenvolvidos geralmente a prevalência de giardíase é mais baixa (FENG e XIAO, 2011). Estudos relataram taxas de infecção de 0,4% a 6,2% na Itália (Crotti et al, 2005; Giangaspero et al, 2007), 5,4% em Espanha (Manzardo et al, 2008),

1,1% a 6,6% na Arábia Saudita (FENG e XIAO, 2011), 2,5% na Coreia do Sul (Huh et al, 2009), 3,7% em Portugal (Almeida et al, 2006), 4,0% na Bélgica (Geurden et al, 2009), 1,3% no Reino Unido (Davies et al, 2009) e 1,4% nos Estados Unidos (Church et al, 2010). Nos países nórdicos, como Dinamarca, Finlândia, Noruega e Suécia, a taxa de infecção por giardíase foi estimada em 2,9% para pessoas assintomáticas e 5,8% para pessoas sintomáticas (Hörman et al 2004). Apesar da prevalência baixa, altas taxas de infecção foram documentadas em algumas regiões pobres dos países desenvolvidos, como, por exemplo, na Itália, onde uma taxa de infecção de 42,9% foi relatada numa pequena comunidade socialmente desfavorecida (FENG e XIAO, 2011; Marangi et al, 2010). Por outro lado, elevadas taxas de infecção foram relatadas em países em desenvolvimento na Ásia (Bangladesh, Camboja, Índia, Indonésia, Laos, Malásia, Nepal, Filipinas e Tailândia), na África (norte da África, oeste da África e África do Sul), na América do Norte (Cuba, México e Nicarágua) e na América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia e Peru), sendo que a maioria desses estudos se focou em crianças (FENG e XIAO, 2011; Berrilli et al, 2006). As infecções por *G. intestinalis* foram documentadas no Brasil. Em um estudo realizado por Tashima e colaboradores (2009) numa creche na região de Presidente Prudente, São Paulo, fezes de 101 crianças de 0 a 6 anos foram analisadas, das quais 15 apresentavam *G. intestinalis*. Das 451 crianças (de 0 a 10 anos) testadas em um estudo realizado em Manaus, Amazonas, 58,7% apresentaram infecção parasitária intestinal, sendo a *G. intestinalis* um dos parasitos mais prevalentes com 21,5% (MAIA et al, 2009). No estudo feito por Santos e colaboradores (2010), foi analisado um total de 431 amostras de fezes de moradores do município de Maria Helena, Paraná, na faixa etária de zero a 89 anos, onde foi observado prevalência de 3,5% de *G. intestinalis*.

O tratamento da giardíase em humanos é feito à base de fármacos antiprotozoários da família dos 5-nitroimidazóis, como metronidazol e tinidazol e por anti-helmínticos da família de benzimidazóis, como mebendazol e albendazol (CERNIKOVA et al, 2018). Esse tratamento farmacológico enfrenta obstáculos visto que esses fármacos provocam efeitos colaterais desagradáveis e resistência do parasito e alguns apresentam falha terapêutica. Os tratamentos de giardíase com metronidazol, tinidazol e albendazol, fracassam a uma taxa de aproximadamente 20% (KULAKOVA et al, 2014). Vários outros fármacos, como, por exemplo, dissulfiram, auranofina, fumagilina, carbadox e tioxidazol (KULAKOVA et al, 2014) e combinações sinérgicas (Sabatke et al, 2022) têm surgido como alternativa. Além disso, até agora não há uma vacina eficaz contra *G. intestinalis* visto que o parasito muda constantemente seus antígenos de superfície permitindo-o evadir o sistema imune, o que torna desafiador o desenvolvimento de vacinas (KULAKOVA et al, 2014).

A *G. intestinalis* apresenta variação antigênica, um mecanismo que possibilita a troca contínua de antígenos de superfície altamente imunogênicos, denominadas proteínas de superfície específicas de variantes (VSPs). Os VSPs revestem toda a superfície do trofozoíto, incluindo o disco ventral e os flagelos (Prucca, e Lujan, 2009; Pimenta et al., 1991). Os trofozoítos sofrem variação antigênica tanto in vivo quanto in vitro (Nash et al., 1991). Acredita-se que é um mecanismo que o parasito usa para enfrentar o ambiente hostil do intestino delgado (Nash et al., 1991), diversificar para infectar uma variedade de hospedeiros e evadir o sistema imunológico do hospedeiro (Prucca, e Lujan, 2009). Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (mAbs) que reconhecem um antígeno de 170.000 dalton presente na superfície de certos parasitos, mas não em outros dentro da população, Nash e Aggarwal (1986) demonstraram que variantes antigênicas de superfície estão presentes em *G. intestinalis*. Em outro estudo foi mostrado que a exposição de clones do isolado WB que apresentam o antígeno de superfície de 170 kDa (VSPA6) a um anticorpo monoclonal citotóxico resultou na morte da maioria dos parasitos, porém alguns sobreviveram. E foi visto que os sobreviventes não apresentavam mais o antígeno de 170 kDa, mas possuíam novos antígenos de superfície (Aggarwal e Nash, 1988; Adam, 2001). A variação antigênica foi mais tarde confirmada em modelos animais, onde os trofozoítos WB expressando o VSPA6 foram inoculados em gerbos, e os trofozoítos coletados de seus intestinos 7 dias depois apresentaram populações que expressam múltiplos VSPs variando em tamanho de 50 a 170 kDa (Adam, 2001). De modo geral, as VSPs são uma família de proteínas ricas em cisteína, com massas moleculares variando de 20 a 200 kDa e com domínio N-terminal altamente variável. Foram documentados que as VSPs sofrem modificações pós-traducionais, como glicosilação, palmitoilação e citrulinação (Prucca, e Lujan, 2009).

Diante dos desafios (impostos pela biologia do parasito) de tratar a *G. intestinalis*, novos alvos relevantes na interação do parasito com hospedeiro e no estabelecimento da infecção tem sido investigado com o intuito de melhor compreender a dinâmica dessa interação e ser capaz de desenvolver novas terapias. Entre esses alvos que podem estar envolvidos na comunicação parasito-parasito ou parasito-hospedeiro estão as vesículas extracelulares (VEs), cuja importância na comunicação celular vem sendo amplamente investigada.

2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

2.3.1 Biogênese de VEs

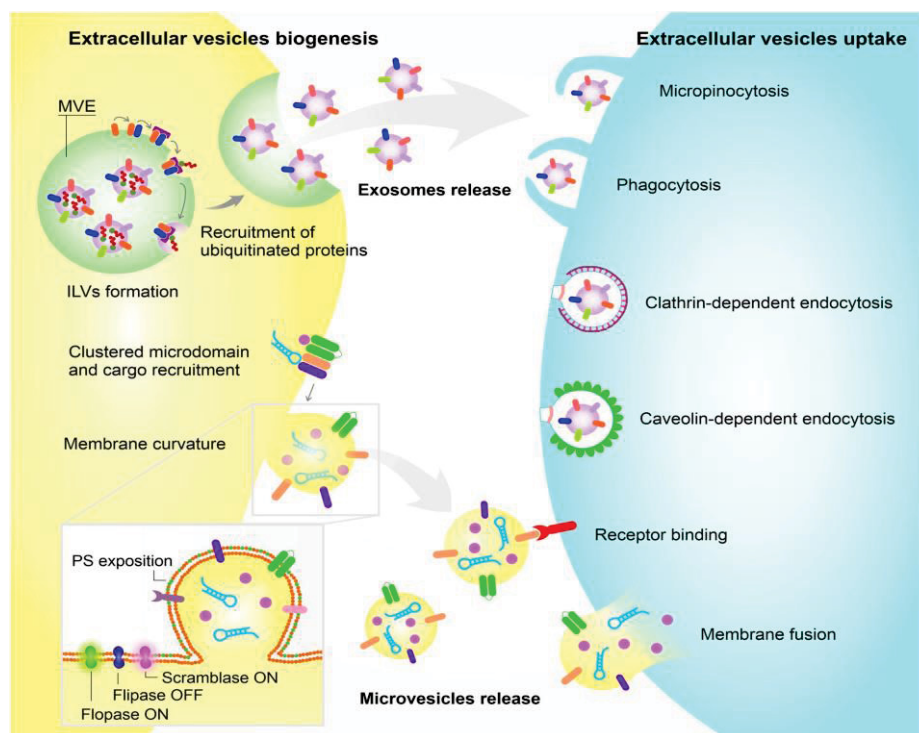
O termo “Vesículas Extracelulares” (VEs) é utilizado para descrever partículas de bicamada lipídica que são liberadas de praticamente todos os organismos procariotos e eucariotos (URABE et al., 2020). Atualmente, as VEs compreendem os exossomos e microvesículas (MVs), diferenciados principalmente pela sua biogênese (HILL, 2019). A

biogênese dos exossomos é um fenômeno da via endossomal que envolve a formação de corpos multivesiculares contendo vesículas intraluminais (ILVs) formadas por brotamento da membrana endossomal (NIEL, 2018). A formação de ILVs trata-se de um processo altamente complexo, no qual vários componentes proteicos e lipídicos estão envolvidos, como ceramidas, GTPase Rab, tetraspaninas, syndecan-1, Syntenin-1, complexo ESCRT (do inglês: endosomal sorting complexes required for transport), sphingomyelinases, entre outros (Moyano et al, 2019; Kalluri and LeBleu, 2020). Destes componentes com papéis na formação de ILVs e conseqüentemente de exossomos, a atuação do complexo ESCRT (0, I, II e III) é a mais bem descrita (HAN et al, 2022). Segundo Larios et al (2020), ESCRT 0, I e II estariam atuando principalmente na triagem de conteúdo a ser carregado no ILV enquanto que o complexo ESCRT III atuaria na deformação da membrana endossomal que resulta no brotamento e fissão das vesículas intraluminais. Os ILVs podem ser degradados pela fusão dos corpos multivesiculares com os lisossomos ou secretados no espaço extracelular pela fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática, onde passam a ser chamadas “exossomos” (Kalluri and LeBleu, 2020).

Diferentemente dos exossomos, as microvesículas (MVs) são liberadas por células diretamente no meio extracelular a partir do brotamento externo da membrana plasmática (Minciacchi et al, 2015; Sabatke et al, 2023). Os brotos que resultam em microvesículas se formam em domínios específicos de membrana, sustentados por citoesqueleto de actina (Crespin et al, 2009), em seguida sofrem fissão e liberados no espaço extracelular como microvesículas (Minciacchi et al, 2015; Kalluri and LeBleu, 2020). O processo é desencadeado por uma série de modificações na assimetria dos lipídios de membrana (por exemplo, exposição de fosfatidilserina na superfície celular externa) e no citoesqueleto de actina. Essas modificações são orquestradas por máquinas enzimáticas dependentes do Ca^{2+} , compreendendo flipases, flopases, scramblases bem como as calpaínas, ativadas em decorrência do aumento dos níveis do Ca^{2+} (MINCIACCHI et al, 2015). Em situações normais, as Translocases de aminofosfolípidios (flipases e flopases) são enzimas importantes na manutenção da assimetria da membrana plasmática na medida em que transportam aminofosfolípidios fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) da monocamada externa para monocamada interna da membrana plasmática. O aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático, no entanto, inibe as enzimas bloqueando a sua ação, enquanto que ativa a scramblase, que causa a exposição do PS no folheto externo da membrana celular, provocando a perda da assimetria fosfolipídica (PICCIN et al, 2007). Essa perda de assimetria causa flexão física da membrana plasmática e rearranjo do citoesqueleto de actina, abrindo o caminho para o brotamento de microvesículas (NIEL, 2018). As

alterações a nível do citoesqueleto também são fundamentais para a liberação de partículas que brotam da membrana plasmática. Segundo Piccin et al (2007), o aumento nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático leva a ativação da calpaína que por sua vez provoca a clivagem de filamentos de actina facilitando a liberação dessas partículas. Crespín et al (2009) mostraram que a inibição da calpaína pelo seu inibidor, calpeptina, provocou redução na biogênese de microvesículas.

FIGURA 2. BIOGÊNESE DE MICROVESÍCULAS E EXOSSOMOS



FONTE: Sabatke et al (2023)

2.3.2 VEs na comunicação celular

As VEs vêm ganhando atenção considerável como um novo mecanismo de comunicação intercelular, atuando na entrega de sua carga (constituída por proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) para células receptoras resultando nas alterações fenotípicas que podem afetar o estado fisiológico dessas células (NIEL et al., 2018; WILLMS et al, 2018)). Para Yáñez-Mó et al (2015) a importância das VEs reside na sua capacidade de transferir informações de uma célula para outra, influenciando assim a função da célula receptora. A diversidade na carga de VEs permite que modulem numerosos processos celulares importantes, como diferenciação celular, coagulação sanguínea, angiogênese, reparação de tecidos, manutenção de células-tronco, entre outros (MARAR et al, 2021; WILLMS et al, 2018).

Os papéis de VEs nos processos fisiopatológicos também vêm sendo amplamente descritos. Nesses processos, segundo Willms et al (2018), os VEs

estabeleceram-se como agentes importantes em doenças como câncer, doenças neurodegenerativas, infecções virais e parasitárias. No contexto de infecções parasitárias, muitos patógenos como *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei*, *Ascaris suum*, *Leishmania spp.*, *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis*, entre outros, secretam VEs que participam na interação do parasito com as células hospedeiras (ZHAO et al., 2021). Após estimularem macrófagos murinos C57BL/6 com VEs isolados das cepas YuYu e CL-14 de *T. cruzi*, Nogueira et al (2015) observaram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e produção do óxido nítrico via TLR2. Li et al (2018) relataram que exossomos de *T. gondii* induziram a produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ . Nievas et al (2017) relataram que *T. vaginalis* libera microvesículas que desempenham um papel na interação parasito-parasito. Foi mostrado por Douanne et al (2022) que em *Leishmania* as VEs atuam na transferência horizontal de genes de resistência aos medicamentos. Vimompatranon et al (2022) observaram um enriquecimento maior de proteínas de virulência que desempenham papel essencial na invasão de hemácias em VEs derivadas de *Plasmodium falciparum*. No caso de *G. intestinalis*, Gavinho et al (2020) descreveu duas populações de VEs produzidas por esse parasito, as VEs maiores (IEVs), na sua maioria microvesículas (MVs) e as VEs menores (sEVs), constituídas principalmente por exossomos. O autor também relatou que a inibição da atividade da enzima peptidil arginina deaminase resulta na diminuição da produção de VEs por *G. intestinalis* alterando sua capacidade de aderir à célula hospedeira, e mostrou que apenas IEVs foram capazes de restaurar a capacidade de adesão à célula hospedeira após o tratamento. Kim et al (2022) mostraram que as VEs de *Giardia* melhoraram os sinais clínicos e reduziram o encurtamento de colón na colite induzida por sulfato de dextrana (DSS). Também foi mostrado por Evans-Osses et al (2017) que as vesículas extracelulares grandes (MVs) produzidas por *G. intestinalis* são capazes de aumentar a adesão de forma trofozoíta desse parasito à superfície de células Caco-2. Siddiq e colaboradores (2020) mostraram que os VEs de *G. intestinalis* têm um efeito bacteriostático em bactérias intestinais comensais, como *E. faecalis* e *E. cloacae*. Além disso, os autores relataram que a exposição a VEs de *Giardia* aumentou a motilidade *E. coli* cepa HB101 e *E. cloacae*.

2.3.3 Isolamento e caracterização de VEs

As VEs podem ser isoladas a partir de diferentes fontes, como, por exemplo, fluidos biológicos, tecidos e meios condicionados (THÉRY et al., 2018). Há uma variedade de métodos que vêm sendo empregados para enriquecer e caracterizar VEs. Algumas dessas metodologias se baseiam no tamanho, densidade e imunoafinidade.

Tais métodos incluem centrifugação diferencial, centrifugação em gradiente de densidade, ultrafiltração, captura baseada em afinidade, ultracentrifugação, cromatografia de exclusão de tamanho, entre outros; porém a centrifugação diferencial é a técnica mais amplamente escolhida (GEORGATZAKOU et al., 2022; BRUSCHI et al., 2023). Essa técnica envolve centrifugações prévias para remover células e detritos celulares, seguidas de centrifugação do sobrenadante livre de células para isolar VEs (TIWARI et al, 2020).

A obtenção de vesículas extracelulares por meio de procedimentos de isolamento apresenta desafios significativos como evidenciado pela variação nos protocolos de isolamento baseados, por exemplo, na centrifugação diferencial utilizados por diferentes grupos: Moosavi et al (2020) → sobrenadante → 20.000 g por 120 minutos a 4°C → VEs; Muralidharan-CHari et al (2009) sobrenadante → 10.000 g 30 min → VEs; Menck et al (2013) sobrenadante → 14.000 g 35 min → VEs; Nievas et al (2017) sobrenadante → 100.000 x g 90 min → VEs; Gavinho et al (2020) sobrenadante → 15.000 x g por 1 h → VEs.

Para Niel et al (2022) devido ao tamanho nanoscópico e heterogeneidade de VEs, faltam ferramentas para estudá-las, o que faz com que seja mais desafiador o seu isolamento e caracterização mais detalhada. Corroborando com esse pensamento, Zhang e colaboradores (2023) alegam que a heterogeneidade de VEs impõe dificuldade no estabelecimento de métodos de isolamento e purificação de populações que as compõem e na compreensão dos seus efeitos na fisiologia e patologia.

Visando diminuir essa heterogeneidade e obter populações mais homogêneas de VEs, muitos métodos de purificação são utilizados, incluindo a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose ou iodixanol que permitem separar VEs em frações. Para Chen et al (2022), o fracionamento por gradiente de densidade é um método tradicional para separar populações de vesículas com base na sua densidade e velocidade de flotação. Nessa técnica usa-se tubos centrífugos pré-carregados com uma série de soluções com diferentes densidades e a separação de VEs ocorre devido à migração de componentes da amostra para suas respectivas densidades no gradiente. Embora útil, é uma técnica que depende de equipamentos caros e longos tempos de operação (TIWARI et al, 2020). Segundo Willms e colaboradores (2018), a velocidade de migração ou taxa de flutuação de VEs no gradiente é determinada pelo seu tamanho, formato e densidade. A separação de subpopulações de VEs em gradiente de sacarose, por exemplo, também não resolve por completo a questão da heterogeneidade, uma vez que permite identificar duas subpopulações com tamanhos distintos, mas com densidade flutuante semelhante (WILLMS et al, 2018). Outro gradiente de densidade muito usado na separação de subpopulações de VEs é o de iodixanol. O iodixanol é uma solução

inerte, de viscosidade relativamente baixa e permite a formação de frações com uma faixa de densidade mais próxima que a da sacarose, o que o permite separar as VEs com maior poder de resolução. As soluções comerciais OptiPrep geralmente contêm 60% de iodixanol dissolvido em água (D'ACUNZO et al, 2022).

Quanto a caracterização de VEs, esta tem sido feita analisando a concentração e distribuição de tamanho das partículas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), visualização por microscopia eletrônica, quantificação e análise de proteína (micro BCA, western blot, proteômica) e por citometria de fluxo (ALLELEIN et al, 2021). As metodologias empregadas no enriquecimento e caracterização de VEs possibilitam classificá-las com base no tamanho, moléculas de superfície ou densidade. Porém, essas formas de separação não dão informação específica e confiável quanto a biogênese, tornando difícil distinguir microvesículas dos exossomos dentro de uma população de VEs, visto que há uma sobreposição de tamanho e composição entre essas duas subpopulações (VAN NIEL et al, 2022). Para Montanari et al (2022), além da sobreposição de tamanho, a sobreposição dos marcadores de superfície e a falta de proteínas restritas a populações específicas também dificulta a distinção entre exossomos e microvesículas. Van Niel et al (2018) acrescenta outro fator limitante na definição de nomenclatura mais precisa para vesículas extracelulares, que é a morfologia semelhante e composição variável. Para Hill (2019), a identificação definitiva também é dificultada devido ao fato de que há parte da carga proteica das microvesículas que se sobrepõe à dos exossomos. O autor ainda alega que mesmo dentro de uma população (de microvesículas ou exossomos) há heterogeneidade.

Apesar dos desafios existentes para distinguir exossomos e microvesículas, há tentativas dessa separação com base em faixa de tamanho que ocupam, porém ainda longe de haver consenso entre os autores, como pode ser visto nos seguintes trabalhos: Crescitelli e colaboradores (2013) consideraram o tamanho de microvesículas variando de 50-1000 nm e exossomos de 40-100 nm; Raposo e colaboradores (2013) definiram tamanho dos exossomos na faixa de 40–100 nm de diâmetro, que, segundo os autores, seria equivalente ao dos ILVs dos corpos multivesiculares dos quais se originam, e as microvesículas são partículas de até 1.000 nm de diâmetro. Os autores ainda alertam que pequenas vesículas de 100 nm podem brotar da superfície celular; Para Willms et al (2018) os exossomos apresentam uma distribuição de tamanho relativamente homogênea que varia de 30-120 nm de diâmetro e as microvesículas variam de 50-1.000 nm de diâmetro; Hill (2019) definiu a população de microvesículas como sendo a mais heterogênea, com diâmetros variando de 100 nm a 1 µm; para Ciardiello et al (2019), exossomos variam de 30-100 nm e microvesículas ocupam a faixa de centenas de nanômetros a poucos microns; na visão de Guo et al (2021), exossomos são VEs com

diâmetro de 30–200 nm e microvesículas são VEs maiores, com tamanhos na faixa de 500-1.000 nm de diâmetro; para Georgatzakou et al (2022) os exossomos são VEs menores que 150 nm e MVs estão na faixa de 50–1000 nm; Montanari e colaboradores (2022) definiram exossomos com tamanho na faixa de 40 a 120 nm, enquanto as microvesículas 50 a 1000 nm; Zhang et al (2023) agruparam VEs em grandes >200nm e pequenos <200nm.

Diante do desafio de encontrar marcadores específicos que informam a origem subcelular de EVs e poder classificá-las em exossomos ou microvesículas, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares aconselha o emprego de termos operacionais, para caracterizar VEs, baseados nas características físicas como tamanho: “pequeno VEs (sEVs) e VEs médias (mEVs) ou grandes VEs (IEVs)”, desde que as faixas de tamanho sejam definidas; densidade (baixo, médio, alto); composição bioquímica; ou células de origem (THÉRY et al, 2018). A mesma sociedade exemplifica essa definição de faixas em: < 100nm ou < 200nm (VEs pequenos), ou > 200nm (VEs grandes e/ou médios). Vale apontar que a classificação de subtipos de VEs vem sendo feita com base nessa orientação (MARAR et al, 2021).

As descobertas crescentes de papéis de VEs na interação patógeno-patógeno ou patógeno-hospedeiro reforçam a necessidade de metodologias que permitam um enriquecimento mais eficiente de VEs de um dado modelo e purificação específica dos subtipos de VEs para uma compreensão clara das propriedades funcionais específicas e/ou compartilhadas destes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Enriquecer por centrifugação diferencial e caracterizar com base no tamanho as VEs produzidas por *G. intestinalis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Definir método para melhorar o enriquecimento de vesículas extracelulares liberadas por *G. intestinalis*;

- Analisar o tamanho de VEs liberadas por *G. intestinalis* sob condição de pH ácido e durante a interação com células Caco-2;

- Enriquecer subpopulações de VEs de *G. intestinalis* por centrifugação em gradiente de sacarose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo de células e parasitos

As formas trofozoítas de *G. intestinalis* (isolado WB) foram cultivadas em 13 mL de meio TYI-S-33 modificado (KEISTER, 1983) (17,11 mM de NaCl; 7,12 mM de K₂HPO₄; 4,41 mM de KH₂PO₄; 3 % extrato de levedura; 0,05% de bile bovina; 55,55 mM de glicose; 16,5 mM de L-cisteína; 1,14 mM de ácido ascórbico) suplementado com 10% de soro adulto bovino (BAS) e 1% de antibiótico (estreptomicina), em tubo falcon de 15 ml, a 37 °C.

Células do epitélio intestinal humano Caco-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (estreptomicina) em frascos de cultura a 37 °C dentro de uma incubadora com 5% de CO₂, como anteriormente descrito por Gavinho et al (2020). As células foram desaderidas a cada três dias usando tripsina e incubação de 3 a 5 minutos a 37°C e passadas para novos frascos de cultura.

4.2. Isolamento de VEs de *G. intestinalis*, células Caco-2 e de interação *G. intestinalis*-Caco-2

A *G. intestinalis* cultivado na fase logarítmica foi colocada em gelo por 15 min para desaderir do tubo de cultivo. Para induzir a liberação de VEs, 1×10^6 /mL do parasita foi incubado em meio TYI-S-33 sem soro, ao qual foi adicionado 1 mM de CaCl₂, a 37 °C por 1 h, em uma incubadora com 5% CO₂. Após decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi centrifugado a 425 x g durante 5 min para remover as células. O sobrenadante desta primeira centrifugação foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 4000 x g durante 30 min para remover os detritos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi separado e utilizado em diferentes experimentos; uma parte foi centrifugada a 15.000x g por 1 h (15 K 1 h pellet), outra parte foi centrifugada a 15.000x g por 4 h (15 K 4 h pellet) e a outra parte foi ultracentrifugação a 100.000x g por 1 h e 30 min (pellet de 100 K 1,5h). O pellet (contendo VEs) foi ressuspenso em PBS 1x e armazenado a 4 °C para análise posterior.

Para o isolamento de VEs de células Caco-2, 2×10^6 células/poço foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram lavadas com meio RPMI sem soro fetal bovino (SFB) e depois incubadas em meio RPMI sem SFB, na presença de 1 mM de CaCl₂, a 37 °C durante 1 h, numa incubadora com 5% de CO₂. Os EVs foram isolados do sobrenadante da cultura utilizando o protocolo descrito acima.

Para a produção de VEs de interação de *G. intestinalis* com células Caco-2, as células Caco-2 (5×10^5 /poço) foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e

incubadas por 24h a 37°C. Após o período de incubação as células foram lavadas com meio RPMI sem SFB e depois incubadas na presença de *G. intestinalis* (1×10^6 /ml). O sobrenadante foi coletado dos poços e centrifugados para remover células e detritos celulares como descrito acima. Em seguida, o sobrenadante livre de células foi centrifugado a 15.000 x g por 4 horas e o pellet contendo VEs foi ressuspenso em PBS 1x. Para efeitos de comparação, a produção de *G. intestinalis* (1×10^6 /ml – total de 6 ml) foi induzida e isolada nas mesmas condições.

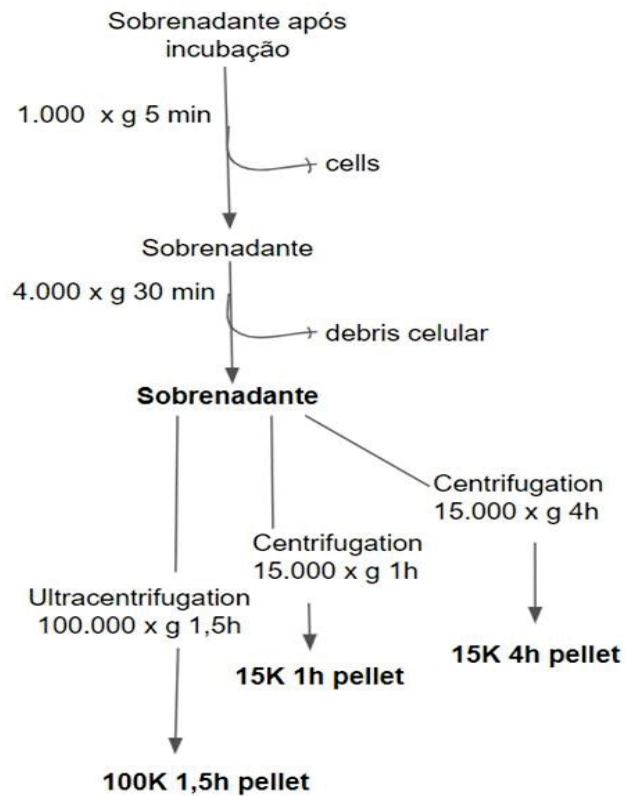
4.3. Isolamento de VEs de *G. intestinalis* em pH ácido

O meio TYI-S-33 sem soro foi ajustado para pH 7 e pH 5, e *G. intestinalis* na concentração de 1×10^6 /mL foi incubado neste meio, com adição de 1 mM de CaCl₂, a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação, o sobrenadante foi centrifugado para remover células e detritos celulares como descrito acima. Em seguida, o sobrenadante livre de células foi centrifugado a 15.000 x g por 4 horas e o pellet contendo VEs foi ressuspenso em PBS 1x.

4.4. Isolamento de VEs de *G. intestinalis* em gradiente de sacarose

Para separação de VEs de *G. intestinalis* em subpopulações, VEs enriquecidas por centrifugação a 15000 x g por 4 horas foram submetidas a um gradiente de sacarose (0,743M a 2M). Amostra de VEs (500 ul) foi colocado no fundo do tubo de ultracentrifuga e as frações de gradiente de sacarose foram aplicadas cuidadosamente sobre as VEs. As amostras foram ultracentrifugadas a 100.000 x g por 16h horas. Após a centrifugação, foram coletadas 6 frações de 2 ml cada e lavadas com PBS 1x a 100.000 x g por 1 hora e 30 minutos. O sedimento (contendo VEs) foi ressuspenso em PBS 1x e armazenado a 4°C para análise posterior.

FIGURA 3. ESQUEMA DO PROTOCOLO PARA ISOLAR VEs



Fonte: autor

4.5. Caracterização de VEs

As VEs foram quantificadas com base em suas concentrações de proteína usando o ensaio Pierce BCA (Thermo Scientific) e por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA-LM10 Nanosight, Malvern, Reino Unido), versão NTA 3.4 Build 3.4.4, que relata a concentração e distribuição de tamanho das partículas. Para NTA, cada amostra foi diluída 1:30 em PBS (1×) e submetida a um Nanosight, com leituras feitas em triplicata durante videos de 60s com Detect Threshold 3. Para fins de análise, consideramos pequenos VEs (sEVs) partículas de até 100 nm de diâmetro, VEs médios (mVEs) partículas com tamanho variando 101 nm de diâmetro a 200 nm de diâmetro e VEs grandes (IEVs) partículas maiores que 200 nm de diâmetro.

4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a visualização da morfologia das VEs, as mesmas foram isoladas pela centrifugação a 15000 x g por 1 hora e por horas, seguindo o protocolo acima descrito, e submetidas à análise por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, as amostras foram então sonicadas por 2 min para obter melhor aspecto das VEs e, em seguida, foram depositadas na grade por 10 minutos para se aderirem. Após o período de adesão, a base da grade foi passada sobre um papel filtro para retirar o excesso da amostra. As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% por 10 min e lavadas com

cacodilato de sódio 0,1 M 3 vezes. Após sucessivas lavagens, as amostras foram colocadas em acetato de uranila a 5% por 3 min para a coloração com contraste negativo e lavados rapidamente em água Milli-Q com resistividade de 18,2 Ω . As amostras devidamente preparadas foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de transmissão da plataforma de microscopia do Instituto Carlos Chagas (ICC)-Paraná.

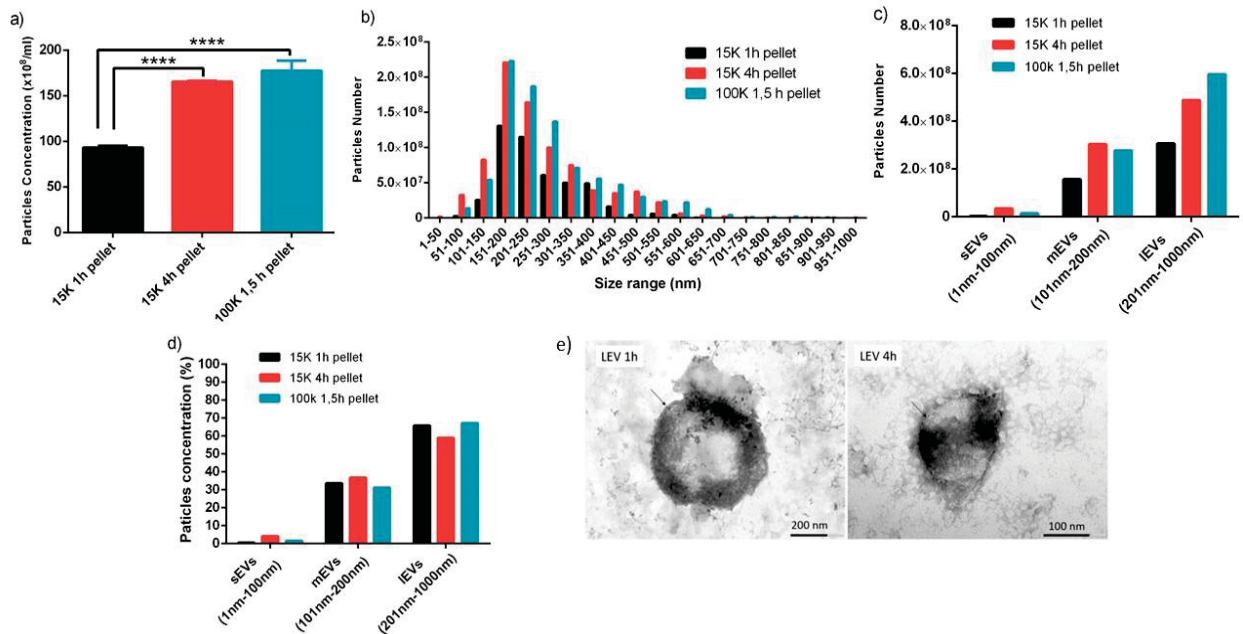
4.7. Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizada ANOVA unidirecional com pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism Inc. versão 6.1.

5. RESULTADOS

5.1 Enriquecimento de vesículas extracelulares de *G. intestinalis* e células Caco-2 por centrifugação diferencial

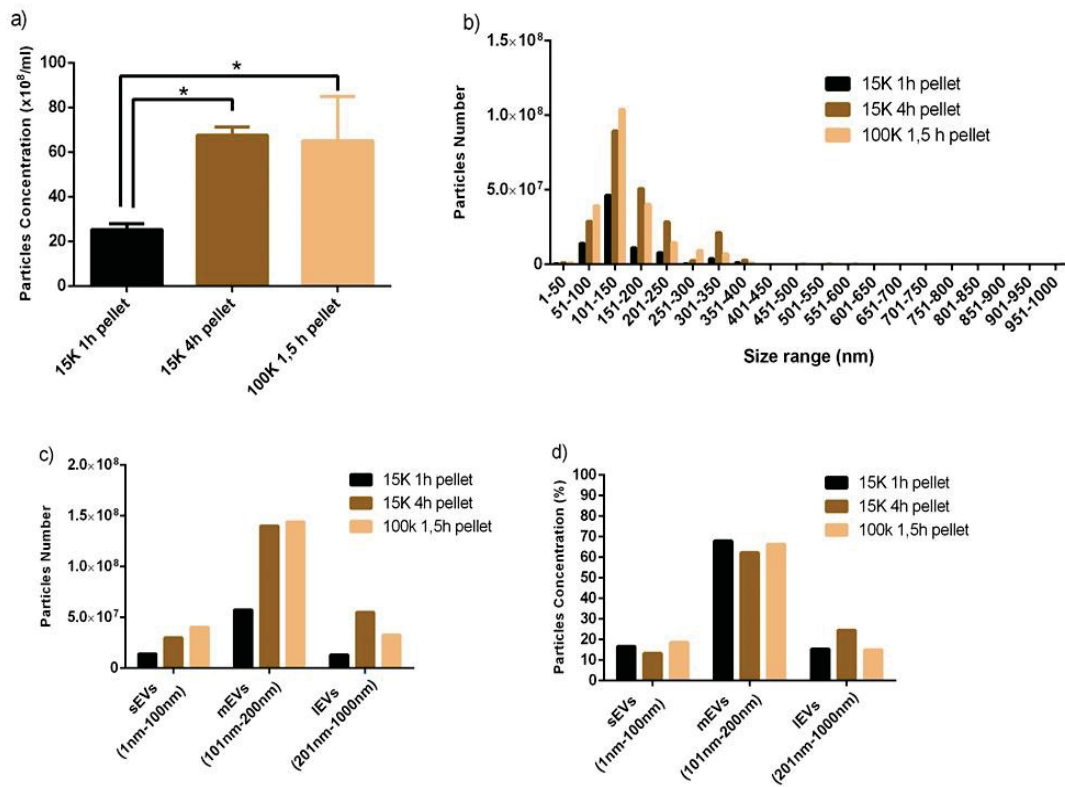
Para o enriquecimento e caracterização física de VEs de *G. intestinalis*, as mesmas foram isoladas por centrifugação diferencial a 15.000 x g por 1 hora (15K 1h pellet) ou 4 horas (15K 4h pellet) e por ultracentrifugação diferencial a 100.000 x g por 1 hora e 30 minutos (100K 1,5h pellet), usando o protocolo descrito na seção de materiais e métodos. As VEs isoladas foram caracterizadas quanto ao tamanho por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Os resultados do NTA mostraram uma concentração de partículas de $93,2 \times 10^8/\text{ml}$, $165,4 \times 10^8/\text{ml}$ e $177,6 \times 10^8/\text{ml}$ no 15K 1h pellet, 15K 4h pellet e 100K 1,5h pellet, respectivamente. Os resultados mostraram que a centrifugação de 15.000 x g 4h e 100.000 x g 1,5h enriqueceram mais as partículas comparativamente à centrifugação a 15.000 x g 1h (Fig. 4a). As três centrifugações concentraram mais partículas na faixa de 151 nm a 300 nm com maior concentração de partículas nos pellets 15K 4h e 100K 1,5h nessa faixa de tamanho (Figura 4b). Analisamos a quantidade de partículas menores que 100 nm (sEVs), partículas médias (mEVs – variando de 100nm a 200nm) e partículas maiores que 200 nm (IEVs). Nas três centrifugações comparadas, nossos resultados mostraram melhor enriquecimento de IEVs em comparação com as mEVs e sEVs, onde número de partículas IEVs foram de $5,9 \times 10^8$, $4,8 \times 10^8$ e 3×10^8 ; mEVs foram $2,7 \times 10^8$, 3×10^8 e $1,5 \times 10^8$; sEVs $1,4 \times 10^7$, $3,4 \times 10^7$ e $2,6 \times 10^6$, nos pellets 100K 1,5h, 15K 4h e no pellet 15K 1h, respectivamente (Figura 4c). Além disso, vimos maior enriquecimento de VEs médias (mEVs) e VEs grandes (IEVs) nos pellets 100K 1,5h e 15K 4h do que no pellet 15K 1h (Figura 4c, d). A figura 4e mostra imagem de microscopia eletrônica de transmissão indicando que as VEs estão intactas.

FIGURA 4 – CARACTERIZAÇÃO DE VES DE *G. intestinalis*

(a) Quantificação da concentração de VEs por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). (b) Distribuição de tamanho de VEs. (c) Número de vesículas extracelulares pequenas (sEVs), médias (mEVs) e grandes (IEVs) em cada pellet. (d) Porcentagem de sEVs, mEVs e IEVs em cada pellet analisado. (e) imagem de microscopia eletrônica de transmissão. Os asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos. **** P < 0.0001. sEVs: small extracellular vesicles (vesículas extracelulares pequenas <100 nm). mEVs: medium extracellular vesicles (vesículas extracelulares médias). IEVs: “large Extracellular Vesicles” (vesículas extracelulares grandes >200 nm).

Também analisamos o enriquecimento de VEs em pellets de 15K 1h, 15K 4h e 100K 1,5h no modelo de célula Caco-2 (Figura 5a – d). As células Caco-2 são uma linhagem celular intestinal humana extraídas do adenocarcinoma de cólon humano, amplamente utilizada para estudar fisiologia intestinal (de SOUZA et al, 2007; NATOLli et al, 2012). Os resultados do NTA mostraram uma concentração de partículas de $25,3 \times 10^8/\text{ml}$, $67,5 \times 10^8/\text{ml}$ e $65,1 \times 10^8/\text{ml}$ no 15K 1h pellet, 15K 4h pellet e 100K 1,5h pellet, respectivamente. A centrifugação a 15K 4h e a 100K 1,5h concentraram mais partículas em comparação à centrifugação a 15K 1h (Figuras 5a), confirmando o resultado observado no modelo de *G. intestinalis*. As três centrifugações concentraram mais partículas na faixa de 101 nm a 150 nm (Figura 5b). Analisamos a quantidade de sEVs, mEVs e IEVs enriquecidas nas três centrifugações (Figura 5c, d) e o resultado mostrou que 100K pellet e 15K 4h pellet também enriqueceram mais mEVs e IEVs em comparação com 15K 1h; e que 15K 4h pellet concentrou mEVs de forma semelhante a 100K 1,5 h, porém mais IEVs (Figura 5c).

FIGURA 5 – CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE CÉLULAS CACO-2

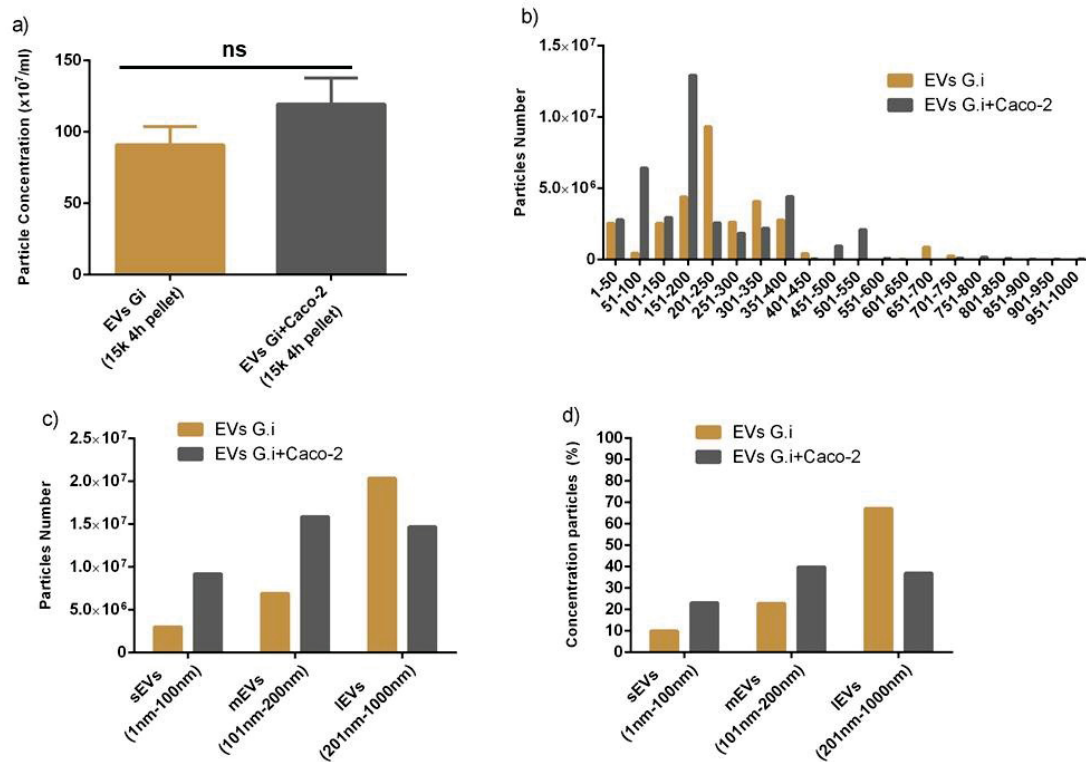


(a) Concentração de VEs liberadas por células Caco-2. (b) Distribuição de tamanho de VEs. (c) Número de sEVs, mEVs e IEVs. (d) Porcentagem de sEVs, mEVs e IEVs em cada pellet analisado. Os asteriscos indicam diferença estatística entre os grupos. * $P < 0.01$.

5.2 Enriquecimento e caracterização de VEs de interação *G. intestinalis*-Caco-2

Uma vez caracterizada o tamanho de VEs produzidas por *G. intestinalis* e células Caco-2 separadamente, nós perguntamos qual das três populações (sEVs, mEVs e IEVs) seria mais enriquecida quando a *G. intestinalis* interagisse com as células Caco-2. Para isso, interagimos *G. intestinalis* (1×10^6 /ml) com células Caco-2 (5×10^5 /poço) por 1h, o sobrenadante foi coletado e, seguindo o protocolo de isolamento de VEs de interação descrita na seção de materiais e métodos, as VEs foram enriquecidas por centrifugação a 15.000 x g por 4 horas (15K 4h pellet) e o tamanho foi caracterizado por NTA. Comparamos essas VEs com as produzidas por *G. intestinalis* sozinho. Não vimos diferença significativa entre a concentração de VEs isoladas da interação *G. intestinalis*-Caco-2 (EVs G.i + Caco-2) e a concentração de VEs produzida pela *G. intestinalis* incubada sozinha (EVs G.i) (Figura 5a). Porém, analisando o tamanho das VEs em cada condição, vimos que o maior pico de concentração de EVs G.i era na faixa de 201 nm a 250 nm, enquanto que de EVs G.i + Caco-2 era na faixa entre 151 nm e 200 nm (Figura 5b). Também vimos que sEVs e mEVs foram mais liberadas na interação *G. intestinalis*-Caco-2 em comparação com *G. intestinalis* sozinho, enquanto que a liberação de IEVs foi maior na *G. intestinalis* sozinho (Figura 5c, d).

FIGURA 6 – CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE INTERAÇÃO *G. intestinalis*-Caco-2

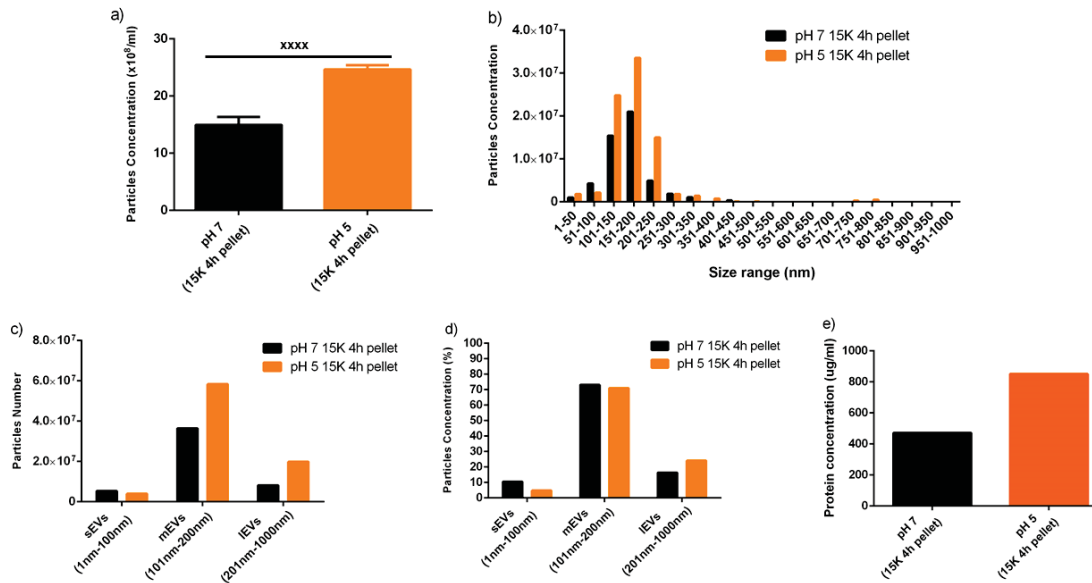


(a) Concentração de VEs liberadas por *G. intestinalis* e na interação *G. intestinalis*-Caco-2. (b) Distribuição de tamanho de VEs. (c) Número de sEVs, mEVs e IEVs. (d) Porcentagem de sEVs, mEVs e IEVs em cada pellet analisado.

5.3 Indução da liberação de VEs de *G. intestinalis* em pH ácido

Devido aos diferentes cenários que *G. Intestinalis* enfrenta no hospedeiro, nós analisamos a liberação de VEs pequenos (sEVs), médios (mEVs) e grandes (IEVs) de *G. intestinalis* sob condições de pH ácido (pH 5) e em pH fisiológico normal (pH 7) sob o qual a *G. intestinalis* é normalmente cultivada (Figura 6a-d). Houve aumento no número de partículas (Figura 6a) e na dosagem de proteínas (Figura 6e) na amostra obtida da exposição do parasito a pH 5 em comparação à exposição a pH 7. Sob condição de pH 5 a concentração de VEs foi de $24,66 \times 10^8/\text{ml}$ e em pH 7 foi de $14,97 \times 10^8/\text{ml}$. Em ambas condições, o maior pico de concentração das partículas está na faixa de 151 nm a 200 nm (Figura 6b). As mEVs e IEVs foram mais enriquecidas em pH 5 (Figura 6d).

FIGURA 7 – CARACTERIZAÇÃO DE VEs DE *G. intestinalis* SOB pH ÁCIDO

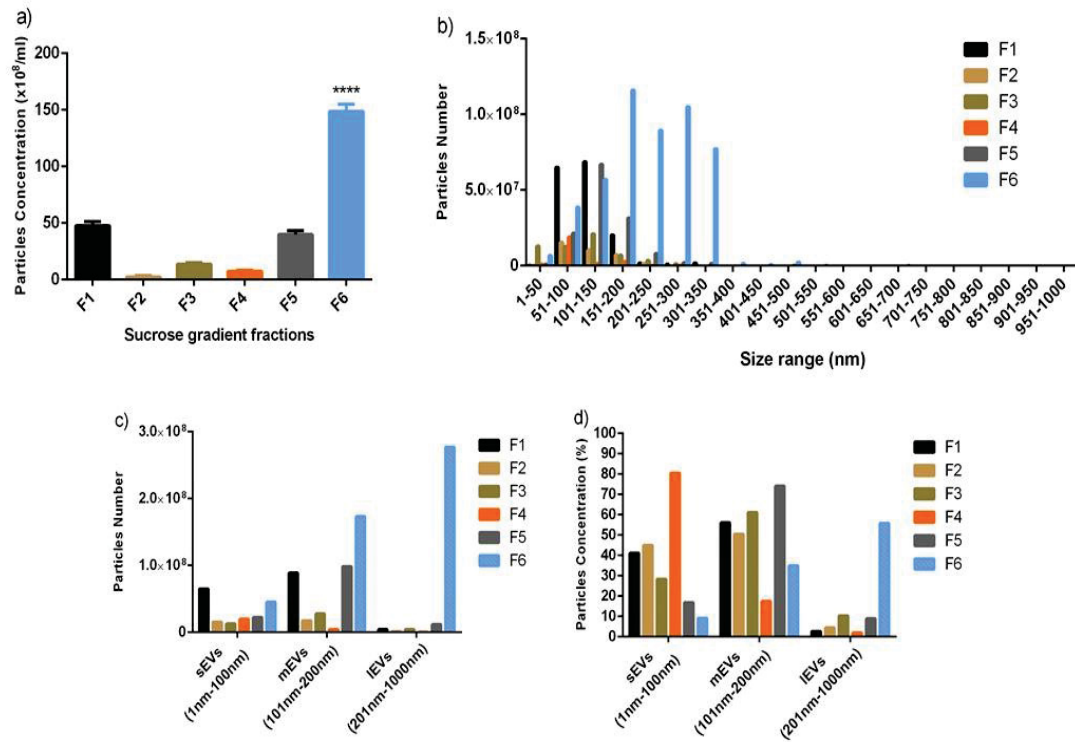


(a) Quantificação da concentração de VEs por NTA; (b) Distribuição de tamanho de VEs; (c) Número de vesículas extracelulares pequenas (sEVs), médios (mEVs) e grandes (IEVs); (d) Porcentagem de sEVs, mEVs e IEVs; (e) Quantificação da concentração de VEs por dosagem de proteína. **** P < 0.0001.

5.4 Enriquecimento de VEs de *G. intestinalis* por gradiente de sacarose

Partindo da observação de que as VEs enriquecidas na centrifugação de 15K 1h, 15K 4h e 100K 1,5h são heterogêneas quanto ao tamanho, decidimos submetê-las a um gradiente de densidade a fim de separá-las em subpopulações menos heterogêneas. Para isso, as VEs foram isoladas do sobrenadante de cultura de *G. intestinalis* através de centrifugação a 15.000 x g 4h e submetidas a um gradiente de sacarose (ver materiais e métodos) e caracterizadas por NTA. Os resultados do NTA mostraram uma maior concentração de partículas na fração 6 do gradiente de sacarose, $148,8 \times 10^8$ /ml (Figura 8a) e a maioria das partículas nessa fração se encontram na faixa de 151 nm a 351 nm (Figura 7b). A fração 1 concentrou $47,7 \times 10^8$ /ml de partículas; fração 2 teve concentração de $2,475 \times 10^8$ /ml; fração 3 concentrou $13,71 \times 10^8$ /ml; fração 4 concentrou $7,44 \times 10^8$ /ml; fração 5 teve $39,9 \times 10^8$ /ml. A fração 1 concentrou mais sEVs e mEVs; a fração 4 concentrou mais as sEVs em relação a mEVs e IEVs; fração 5 concentrou mais mEVs em comparação a sEVs e IEVs. A maioria das partículas na fração 6 foram IEVs ($2,7 \times 10^8$), seguida de uma concentração expressiva de mEVs, $1,7 \times 10^8$ (Figura 7b-c).

FIGURA 7 – QUANTIFICAÇÃO DE VEs DE *G. intestinalis* ENRIQUECIDAS POR GRADIENTE DE SACAROSE



(a) Concentração da VEs em cada fração de gradiente de sacarose; (b) Distribuição de tamanho de VEs; (c) Número de vesículas extracelulares pequenas (sEVs), médios (mEVs) e grandes (IEVs); (d) Porcentagem de sEVs, mEVs e IEVs em cada fração de gradiente de sacarose. F = fração. Os asteriscos indicam diferença estatística entre a fração 6 e as demais - **** P < 0.0001.

6. DISCUSSÃO

A produção de VEs por *G. intestinalis* já foi descrita em outros trabalhos (Evans-Osses et al, 2017; Kim et al, 2022; Siddiq et al, 2020; Gavinho et al, 2020). Aqui enriquecemos e caracterizamos o tamanho das VEs liberadas por *G. intestinalis* e durante a interação do parasito com células Caco-2. Há uma variedade de métodos que têm sido empregados para enriquecer VEs. Alguns são baseados no tamanho (por exemplo, centrifugação diferencial, ultracentrifugação diferencial, ultrafiltração e cromatografia de exclusão de tamanho), gradiente de densidade (gradiente de sacarose e iodixanol), imunoafinidade, entre outros (Hallelein et al, 2021). Normalmente estes métodos de isolamento resultam em partículas heterogêneas enriquecidas em uma ou mais populações de VEs (Nievas et al, 2020). Neste estudo, demonstramos uma metodologia baseada na centrifugação diferencial, que pode ser utilizada para melhorar o enriquecimento das VEs de *G. intestinalis*, o que pode melhorar a compreensão dos papéis dessas vesículas na interação patógeno-hospedeiro. Além disso, em razão da falta de propriedade física ou marcador molecular descrita que possa distinguir claramente os exossomos das microvesículas, visto que há sobreposição de tamanho e marcadores (Nievas et al, 2020), caracterizamos com base no tamanho as VEs enriquecidas, agrupando-as em três populações (sEVs: até 100 nm; mEVs: entre 100 nm 200 nm; e IEVs: > 200 nm). Quanto ao rendimento total de partículas nas três centrifugações comparadas, vimos um aumento de 77,4% e 90,5% na centrifugação a 15000 x g por 4 horas e 100.000 x g por 1 hora e meia, respectivamente, em relação à concentração de VEs isoladas na centrifugação a 15000 x g por 1 hora. Portanto, aqui mostramos que os tempos de centrifugação prolongados e alta força centrífuga relativa (RFC) podem melhorar o rendimento de vesículas extracelulares de *G. intestinalis* isoladas do meio condicionado. Nosso resultado conversa com os de Cvjetkovic e colaboradores (2014) que mostraram que tempo de centrifugação mais longo (114 minutos) alcançou maior rendimento de VEs em relação a tempo menor (70 minutos). Comparamos o enriquecimento de VEs na centrifugação a 15000 x g por 4 horas com a ultracentrifugação a 100.000 x g por 1 hora e 30 minutos. Nossos resultados mostraram que a centrifugação de 15.000 x g 4h foi capaz de concentrar nos mesmos níveis de concentração de partículas que uma ultracentrifugação direta a 100.000 x g 1 hora e meia. Isso sugere que um bom rendimento de VEs pode ser alcançado com uma centrífuga de bancada, desde que tempos prolongados de centrifugação sejam empregados.

Quanto às três grupos de VEs (sEVs, mEVs e IEVs) nossos resultados sugerem que as mEVs e IEVs podem ser melhor enriquecidas por centrifugação diferencial a 15.000 x g por 4 h e pela ultracentrifugação a 100.000 x g 1,5h. No entanto,

em relação à pureza, a centrifugação diferencial a $15.000 \times g$ por 1 hora contém menos sEVs contaminantes em comparação com a centrifugação diferencial a $15.000 \times g$ por 4 h, ou seja, purificou melhor as mEVs e IEVs. Com este protocolo, as VEs acima de 100 nm (mEVs e IEVs) podem ser enriquecidas sem a necessidade de ultracentrífuga, que é um equipamento caro, e pode ser um fator limitante para muitos grupos de pesquisa que desejam estudar vesículas extracelulares.

Com o intuito de saber se esse protocolo de enriquecimento de VEs aplicado em *G. intestinalis* pode ser válido em outros tipos celulares, aplicamos a metodologia para enriquecer as VEs no modelo de células Caco-2. Também vimos um rendimento maior de VEs na centrifugação a $15000 \times g$ por 4 horas e na ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 1 hora e 30 minutos em relação a centrifugação a $15000 \times g$ por 1 hora. Isso sugere que independentemente da fonte de VEs, enriquecimento maior pode ser obtido centrifugando por 4 horas a $15000 \times g$ ou ultracentrifugando a $100.000 \times g$ por 1 hora e 30 minutos.

Não vimos um aumento significativo na concentração de VEs quando comparamos a quantidade de VEs liberadas durante a interação de *G. intestinalis* com células Caco-2 com as produzidas por *G. intestinalis* incubada sozinha. Talvez durante a interação ocorra a inibição parcial ou total da liberação de VEs de uma das células, fusão das VEs ou um aumento no uptake, que reduz a quantidade de VEs no sobrenadante. São pontos que podem ser avaliados para entender melhor a dinâmica de liberação de VEs no contexto de interação. No modelo de *T. cruzi* foi mostrado por Ramirez et al (2017) que durante a interação de diferentes estágios do parasito com as células THP1 ocorre maior liberação de VEs em comparação com os parasitos sozinhos e que nessa interação tanto o parasito quanto a célula hospedeira liberam VEs.

Também isolamos e caracterizamos as VEs liberadas sob condição de pH ácido (pH5) com intuito de saber se o perfil de VEs muda dependendo do estímulo ou variações no ambiente, uma vez que o parasito enfrenta diferentes cenários ambientais ao longo do ciclo de vida. A estimulação da produção de VEs por fatores ambientais tem sido investigada em diversos modelos. Shao et al (2018) observaram um aumento na produção de exossomos sob condições hipóxicas em células cancerígenas. Além disso, também foi descrito que a privação de glicose estimula os cardiomiócitos H9C2 a produzir mais EVs (GARCIA et al, 2015). O pH baixo foi apontado como fator estimulador na liberação de VEs com níveis elevados de colesterol e caveolina-1 (HAHM et al, 2021). Evans-Osses et al (2017) observaram que *G. intestinalis* é capaz de produzir IEVs sob diferentes condições ambientais, inclusive em pH 5. Aqui estimulamos a produção de VEs incubando *G. intestinalis* em pH 5 e as VEs isoladas foram comparadas quanto ao enriquecimento de sEVs, mEVs e IEVs com VEs produzidas sob pH 7. Vimos maior liberação de VEs totais em pH 5 (um aumento de 64,7%) em comparação a pH 7. As

VEs em pH 5 eram na sua maioria IEVs e mEVs quando comparadas com as subpopulações de VEs liberadas sob pH 7. Nossos resultados sugerem que em pH 5, *G. intestinalis* produz maior quantidade de IEVs (> 200 nm), consideradas na sua maioria provenientes da membrana plasmática, em comparação a pH 7. O brotamento de VEs a partir da membrana plasmática é um fenômeno desencadeado por alteração na assimetria dos lipídios de membrana, onde o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático inibe as flopases e flipases bloqueando a sua ação, enquanto que ativa a scramblase, que causa a exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana celular, provocando a perda da assimetria fosfolipídica (PICCIN et al, 2007; STOUT et al, 1997). Essa perda na assimetria abre o caminho para o brotamento de microvesículas (NIEL, 2018). Em um estudo, Stout e colaboradores (1997) mostraram que em pH ácido, $pH < 6$, a atividade de scramblase é ativada em eritrócitos de pacientes com síndrome de Scott, um distúrbio hemorrágico congênito relacionado à expressão anormal da atividade coagulante da membrana. Portanto, nosso resultado sugere um efeito do pH ácido na membrana plasmática que provoca alterações na assimetria da membrana plasmática de *G. intestinalis*, levando ao surgimento de VEs maiores (IEVs). Este estudo pode ser ampliado analisando diferentes valores de pH ácido e básico.

Um dos parâmetros empregados no isolamento e caracterização de VEs é a densidade (THÉRY et al, 2018). Portanto, a centrifugação em gradiente de densidade é uma técnica amplamente usada para enriquecer subpopulações de VEs (TIWARI et al, 2020). Neste trabalho isolamos VEs utilizando o gradiente de densidade de sacarose e caracterizamos o tamanho de VEs enriquecidas em cada fração do gradiente. Vimos que algumas frações foram mais heterogêneas quanto a faixa de tamanho de VEs enriquecidas, como a fração 6, que embora tenha enriquecido mais partículas IEVs (56%), também teve enriquecimento expressivo de mEVs (35%) e poucas sEVs (9%). Outras frações, como a 2 e 4, concentraram muito mais partículas sEVs e mEVs, embora tenham enriquecido poucas IEVs (4% e 2%, respectivamente). Embora não tenhamos analisado a densidade de cada fração do gradiente, o enriquecimento de VEs com tamanhos iguais em diferentes frações do gradiente sugere que possuem densidades diferentes, o que possivelmente remete a uma heterogeneidade no conteúdo que carregam. Também mostra a complexidade de purificar subpopulações específicas de VEs.

Certamente, os mecanismos que controlam a biogênese e as diferentes especializações das subpopulações de vesículas ainda são incertos; no entanto, um método simples para alcançar o enriquecimento de VEs abre a porta para futuras investigações sobre a dinâmica da liberação de vesículas em diferentes modelos biológicos e em diferentes condições.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vimos que os VEs liberados por *G. intestinalis* podem ser melhor enriquecidos por ultracentrifugação direta a 100.000 x g, 1,5 h, ou por centrifugação a 15.000 x g, 4 h. Este último pode ser feito utilizando uma centrífuga de bancada, o que pode ser útil para pesquisadores que desejam investigar o papel das VEs, mas não possuem uma ultracentrífuga. Também vimos que as três centrifugações comparadas podem enriquecer VEs de *G. intestinalis* altamente heterogêneas quanto ao tamanho, variando de sEVs a IEVs. Porém quando submetidas a um gradiente de sacarose, essa heterogeneidade pode ser reduzida em algumas frações do gradiente. Espera-se que este trabalho possa auxiliar no estudo de VEs.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para melhor compreender o papel de diferentes subpopulações de VEs de *G. intestinalis* na interação do parasito com o hospedeiro, estudos a seguir podem ser feitos:

1. Purificar sEVs, mEVs e IEVs com outros métodos como cromatografia por exclusão de tamanho;
2. Avaliar efeitos de cada população de VEs na capacidade de adesão do parasito às células hospedeiras, inibição ou ativação do sistema complemento, na quebra da barreira do epitélio intestinal e na modulação da microbiota intestinal. Também investigar o uptake dessas VEs por células Caco-2.
3. Avaliar o conteúdo proteico e lipídico das VEs por proteômica e lipidômica, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Adam, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 2001.
- Aggarwal, A., & Nash, T. E. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. Infection and immunity, 1988.
- Allelein, S.; Medina-Perez, P.; Lopes, A.L.H.; Rau, S.; Hause, G.; Kölsch, A.; Kuhlmeier, D. Potential and challenges of specifically isolating extracellular vesicles from heterogeneous populations. Sci. Rep. 2021.
- Almeida, A. A., Delgado, M. L., Soares, S. C., Castro, A. O., Moreira, M. J., Mendonça, C. M., Canada, N. B., & Da Costa, J. M. Genotype analysis of *Giardia* isolated from asymptomatic children in northern Portugal. The Journal of eukaryotic microbiology, 2006.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nature reviews. Microbiology, 2010.
- Berrilli, F., Di Cave, D., D'Orazi, C., Orecchia, P., Xhelilaj, L., Bejko, D., Caça, P., Bebeci, D., Cenko, F., Donia, D., & Divizia, M. Prevalence and genotyping of human isolates of *Giardia duodenalis* from Albania. Parasitology international, 2006.
- Bruschi, M., Candiano, G., Angeletti, A., Lugani, F., & Panfoli, I. Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Glomerulonephritis. International journal of molecular sciences, 2023.
- Cernikova, L.; Faso, C.; Hehl, A.B. Five facts about *Giardia lamblia*. PLoS Pathog. 2018.
- Chen, A., He, B., & Jin, H. Isolation of Extracellular Vesicles from *Arabidopsis*. Current protocols, 2022.
- Church, C., Neill, A., & Schotthoefer, A. M. Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. The Journal of parasitology, 2010.
- Ciardello, C., Migliorino, R., Leone, A., & Budillon, A. Large extracellular vesicles: Size matters in tumor progression. Cytokine & growth factor reviews, 2020.
- Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E. I., & Lötvall, J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. Journal of extracellular vesicles, 2013.
- Crespin, M., Vidal, C., Picard, F., Lacombe, C., & Fontenay, M. Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis, 2009.
- Crotti, D., D'Annibale, M. L., Fonzo, G., Lalle, M., Cacciò, S. M., & Pozio, E. *Dientamoeba fragilis* is more prevalent than *Giardia duodenalis* in children and adults attending a day care centre in Central Italy. Parasite, 2005.
- Cvjetkovic, A., Lötvall, J., & Lässer, C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. Journal of extracellular vesicles, 1014.

D'Acunzo, P., Kim, Y., Ungania, J. M. Pérez-González, R., Goulbourne, C. N., Levy, E. Isolation of mitochondria-derived mitovesicles and subpopulations of microvesicles and exosomes from brain tissues. *Nature protocols*, 2022.

Davies, A. P., Campbell, B., Evans, M. R., Bone, A., Roche, A., & Chalmers, R. M. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *The Pediatric infectious disease journal*, 2009.

de Souza, J. Zaida Maria F. Freitas, Silvia Storpirtis. In vitro models for the determination of drug absorption and a prediction of dissolution/absorption relationships. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2007

Douanne, N., Dong, G., Amin, A., Bernardo, L., Blanchette, M., Langlais, D., Olivier, M., & Fernandez-Prada, C. Leishmania parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles. *Cell reports*, 2022.

Einarsson, E.; Ma'ayeh, S.; Svärd, S.G. An up-date on Giardia and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016.

Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., & Pawley, J. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *The Journal of parasitology*, 1989.

Evans-Osses, I., Ansa-Addo, E. A., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. Involvement of lectin pathway activation in the complement killing of *Giardia intestinalis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010.

Evans-Osses, I.; Mojoli, A.; Monguió-Tortajada, M.; Marcilla, A.; Aran, V.; Amorim, M.; Inal, J.; Borràs, F.E.; Ramirez, M.I. Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 2017.

Feng, Y., & Xiao, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, 2011.

Fink, M.Y.; Shapiro, D.; Singer, S.M. *Giardia lamblia*: Laboratory Maintenance, Lifecycle Induction, and Infection of Murine Models. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2020.

Garcia, N.A.; Ontoria-Oviedo, I.; González-King, H.; Diez-Juan, A.; Sepúlveda, P. Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *PLoS ONE* 2015.

Gavinho, B.; Sabatke, B.; Feijoli, V.; Rossi, I.V.; da Silva, J.M.; Evans-Osses, I.; Palmisano, G.; Lange, S.; Ramirez, M.I. Peptidylarginine Deiminase Inhibition Abolishes the Production of Large Extracellular Vesicles From *Giardia intestinalis*, Affecting Host-Pathogen Interactions by Hindering Adhesion to Host Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020.

Georgatzakou, H. T., Fortis, S. P., Papageorgiou, E. G., Antonelou, M. H., & Kriebardis, A. G. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. *Biomolecules*, 2022.

Geurden, T., Levecke, B., Cacció, S. M., Visser, A., De Groote, G., Casaert, S., Vercruyse, J., & Claerebout, E. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology*, 2009.

- Giangaspero, A., Berrilli, F., & Brandonisio, O. Giardia and Cryptosporidium and public health: the epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitology* 2007.
- Gillin, F. D., Reiner, D. S., & McCaffery, J. M. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual review of microbiology*, 1996.
- Guo, J., Wu, C., Lin, X., Zhou, J., Zhang, J., Zheng, W., Wang, T., & Cui, Y. Establishment of a simplified dichotomic size-exclusion chromatography for isolating extracellular vesicles toward clinical applications. *Journal of extracellular vesicles*, 2021.
- Hahm, J.; Kim, J.; Park, J. Strategies to Enhance Extracellular Vesicle Production. *Tissue Eng. Regen. Med.* 2021.
- Han, Q. F., Li, W. J., Hu, K. S., Gao, J., Zhai, W. L., Yang, J. H., & Zhang, S. J. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular cancer*, 2022.
- Hill, A.F. Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. *J. Neurosci.* 2019, 39, 9269–9273. [Google Scholar] [CrossRef]
- Hörman, A., Korpela, H., Sutinen, J., Wedel, H., & Hänninen, M. L. Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. infections in humans in the Nordic countries. *International journal for parasitology*, 2004.
- Huh, J. W., Moon, S. G., & Lim, Y. H. A survey of intestinal protozoan infections among gastroenteritis patients during a 3-year period (2004-2006) in Gyeonggi-do (province), South Korea. *The Korean journal of parasitology*, 2009.
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* (New York, N.Y.), 2020.
- Karam P, Rosenhek-Goldian I, Ziv T, Ben Ami Pilo H, Azuri I, Rivkin A, Kiper E, Rotkopf R, Cohen SR, Torrecilhas AC, Avinoam O, Rojas A, Morandi MI, Regev-Rudzki N. Malaria parasites release vesicle subpopulations with signatures of different destinations. *EMBO Rep.* 2022.
- Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983.
- Kim HJ, Lee YJ, Back SO, Cho SH, Lee HI, Lee MR. Treatment with Extracellular Vesicles from *Giardia lamblia* Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in C57BL/6 Mice. *Korean J Parasitol.*, 2022.
- Kim, H.J.; Lee, Y.-J.; Back, S.-O.; Cho, S.-H.; Lee, H.-I.; Lee, M.-R. Treatment with Extracellular Vesicles from *Giardia lamblia* Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in C57BL/6 Mice. *Korean J. Parasitol.* 2022.
- Kulakova, L.; Galkin, A.; Chen, C.Z.; Southall, N.; Marugan, J.J.; Zheng, W.; Herzberg, O. Discovery of Novel Antigiardiasis Drug Candidates. *ASM J. Antimicrob. Agents Chemother.* 2014.
- Larios, J., Mercier, V., Roux, A., & Gruenberg, J. ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting

of tetraspanins to exosomes. *The Journal of cell biology*, 2020.

Li Y, Xiu F, Mou Z, Xue Z, Du H, Zhou C, Li Y, Shi Y, He S, Zhou H. Exosomes derived from *Toxoplasma gondii* stimulate an inflammatory response through JNK signaling pathway. *Nanomedicine (Lond)*. 2018.

Maia, M. M., Fausto, M. A., Vieira, E. L., Benetton, M. L., & Carneiro, M. Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 2009.

Manzardo, C., Treviño, B., Gómez i Prat, J., Cabezos, J., Monguí, E., Clavería, I., Luis Del Val, J., Zabaleta, E., Zarzuela, F., & Navarro, R. Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. *Travel medicine and infectious disease*, 2008.

Marangi, M., Berrilli, F., Otranto, D., & Giangaspero, A. Genotyping of *Giardia duodenalis* among children and dogs in a closed socially deprived community from Italy. *Zoonoses and public health*, 2010.

Marar, C., Starich, B., & Wirtz, D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nature immunology*, 2021.

Menck, K.; Klemm, F.; Gross, J.C.; Pukrop, T.; Wenzel, D.; Binder, C. Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget* 2013.

Minciacchi, V. R., Freeman, M. R., & Di Vizio, D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Seminars in cell & developmental biology*, 2015

Montanari, M., Guescini, M., Gundogdu, O., Luchetti, F., Lanuti, P., Ciacci, C., Burattini, S., Campana, R., Ortolani, C., Papa, S., & Canonico, B. Extracellular Vesicles from *Campylobacter jejuni* CDT-Treated Caco-2 Cells Inhibit Proliferation of Tumour Intestinal Caco-2 Cells and Myeloid U937 Cells: Detailing the Global Cell Response for Potential Application in Anti-Tumour Strategies. *International journal of molecular sciences*, 2022.

Moosavi, S. M., Akhavan Sepahi, A., Mousavi, S. F., Vaziri, F., & Siadat, S. D. The effect of *Faecalibacterium prausnitzii* and its extracellular vesicles on the permeability of intestinal epithelial cells and expression of PPARs and ANGPTL4 in the Caco-2 cell culture model. *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 2020.

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

Muralidharan-Chari, V.; Clancy, J.; Plou, C.; Romao, M.; Chavrier, P.; Raposo, G.; D'Souza-Schorey, C. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr. Biol*. 2009

Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F., & Felsani, A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, (2012).

- Nash, T. E., Merritt, J. W., Jr, & Conrad, J. T. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infection and immunity*, 1991.
- Nievas, Y. R., Lizarraga, A., Salas, N., Cóceres, V. M., de Miguel, N. (2020). Extracellular vesicles released by anaerobic protozoan parasites: Current situation. *Cellular microbiology*, 22(11), e13257. <https://doi.org/10.1111/cmi.13257>
- Nievas, Y.R. Coceres, V.M.; Midlej, V. de Souza, W.Benchimol, M.; Pereira-Neves, A.Vashisht, A.A. Wohlschlegel, J.A. Johnson, P.J.; de Miguel, N. Vesículas membranares do parasita *Trichomonas vaginalis* :caracterização e sua associação com interação celular. *Célula. Mol. Ciência da Vida*. 2017.
- Nogueira PM, Ribeiro K et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles*. 2015.
- Piccin, A., Murphy, W. G., & Smith, O. P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews*, 2007.
- Pimenta, P. F., da Silva, P. P., & Nash, T. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infection and immunity*, 1991.
- Prucca, C. G., & Lujan, H. D. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular microbiology*, 2009.
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., & Evans-Osses, I. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cellular microbiology*, 2017.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 2013
- Rey, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais – 4. Ed.*- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- Rojas-López, L.;Marques, R. C. Marques; Svärd, S. G. *Giardia duodenalis*, *Trends in Parasitology*, v.38, 2022.
- SABATKE,B. Avaliação do efeito dos polissacarídeos na interação in vitro entre os trofozoítos de *Giardia intestinalis* e drogas antiparasitárias, 2021.
- Sabatke, B., Chaves, P. F. P., Cordeiro, L. M. C., & Ramirez, M. I. Synergistic Effect of Polysaccharides from Chamomile Tea with Nitazoxanide Increases Treatment Efficacy against *Giardia intestinalis*. *Life*, 2022.
- Sabatke, B., Rossi, I. V., Sana, A., Bonato, L. B., & Ramirez, M. I. Extracellular vesicles biogenesis and uptake concepts: A comprehensive guide to studying host-pathogen communication. *Molecular microbiology*, 2023.
- Santos, S. A., & Merlini, L. S. (2010). Prevalência de enteroparasitoses na população do município de Maria Helena, Paraná [Prevalence of enteroparasitosis in the population of Maria Helena, Paraná State]. *Ciencia & saude coletiva*,
- Shao, C.; Yang, F.; Miao, S.; Liu, W.; Wang, C.; Shu, Y.; Shen, H. Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Mol. Cancer* 2018.
- Siddiq, A., Allain, T., Dong, G., Olivier, M., & Buret, A. *Giardia* extracellular vesicles disrupt intestinal epithelial junctions and inhibit the growth of commensal bacteria while

increasing their swimming motility, 2020.

Stout, J. G., Bassé, F., Luhm, R. A., Weiss, H. J., Wiedmer, T., & Sims, P. J. Scott syndrome erythrocytes contain a membrane protein capable of mediating Ca²⁺-dependent transbilayer migration of membrane phospholipids. *The Journal of clinical investigation*, 1997.

Tashima, N. T., Simões, M. J., Leite, C. Q., Fluminhan, A., Nogueira, M. A., & Malaspina, A. C. Classic and molecular study of *Giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2009.

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 2018

Thompson, R. C., Palmer, C. S., & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 2007

Tiwari, S., Kumar, V., Randhawa, S., & Verma, S. K. Preparation and characterization of extracellular vesicles. *American journal of reproductive immunology*, 2021.

Urabe, F.; Kosaka, N.; Ito, K.; Kimura, T.; Egawa, S.; Ochiya, T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am. J. Physiol. Physiol.* 2020

van Niel, G., Carter, D. R. F., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., & Vader, P. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2022.

Van Niel, G.; D'Angelo, G.; Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018.

Vimonpatranon, S., Roytrakul, S., Phaonakrop, N., Lekmanee, K., Atipimonpat, A., Srimark, N., Sukapirom, K., Chotivanich, K., Khowawisetsut, L., & Pattanapanyasat, K. Extracellular Vesicles Derived from Early and Late Stage *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells Contain Invasion-Associated Proteins. *Journal of clinical medicine*, 2022

Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J. A., & Vader, P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Frontiers in immunology*, 2018.

Xiao, L., & Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International journal for parasitology*, 38(11), 1239–1255. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.006>

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., ... De Wever, O.. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles* 2015

Zhang, Q., Jeppesen, D. K., Higginbotham, J. N., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. Comprehensive isolation of extracellular vesicles and nanoparticles. *Nature protocols*, 2023.

Zhao P, Cao L, Wang X, Li J, Dong J, Zhang N, Li X, Li S, Sun M, Zhang X, Liang M, Pu X, Gong P. *Giardia duodenalis* extracellular vesicles regulate the proinflammatory immune response in mouse macrophages in vitro via the MAPK, AKT and NF- κ B pathways. *Parasit Vectors*. 2021.