

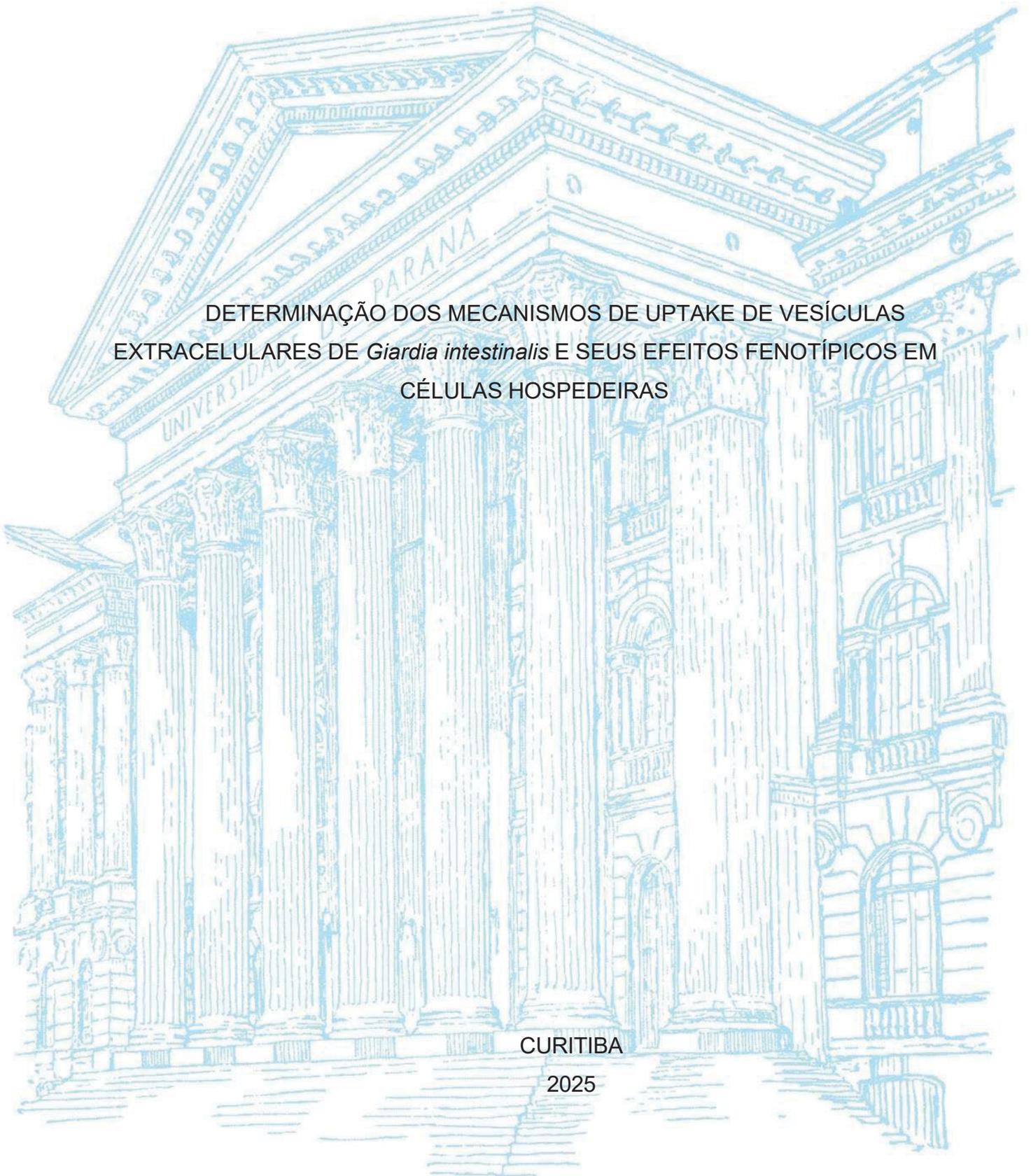
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA FERNANDA DOS SANTOS SABATKE

DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE UPTAKE DE VESÍCULAS  
EXTRACELULARES DE *Giardia intestinalis* E SEUS EFEITOS FENOTÍPICOS EM  
CÉLULAS HOSPEDEIRAS

CURITIBA

2025



BRUNA FERNANDA DOS SANTOS SABATKE

DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE UPTAKE DE VESÍCULAS  
EXTRACELULARES DE *Giardia intestinalis* E SEUS EFEITOS FENOTÍPICOS EM  
CÉLULAS HOSPEDEIRAS

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 Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

CURITIBA

2025

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

Sabatke, Bruna, 1996-

Determinação dos mecanismos de Uptake de vesículas extracelulares de *Giardia intestinalis* e seus efeitos fenotípicos em células hospedeiras / Bruna Fernanda dos Santos Sabatke. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya.

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE 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 MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BRUNA FERNANDA DOS SANTOS SABATKE**, intitulada: "**Determinação dos Mecanismos de Uptake de vesículas extracelulares de *Giardia intestinalis* e seus efeitos fenotípicos em células hospederiras**", sob orientação do Prof. Dr. MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 24 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

03/04/2025 10:42:03.0

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/04/2025 12:21:48.0

ANTONIO MARCILLA DIAZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE VALÊNCIA)

Assinatura Eletrônica

15/04/2025 14:54:14.0

JAMEEL INAL

Avaliador Externo (LONDON METROPOLITAN UNIVERSITY)

Assinatura Eletrônica

30/04/2025 00:04:41.0

GEORGIA CORREA ATELLA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica

03/04/2025 10:37:41.0

LEONARDO NIMRICHTER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

---

Avenida Coronel Francisco H. dos Santos, 100 - Curitiba - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1695 - E-mail: posmpp@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 438065

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 438065

Dedico este trabalho ao meu pai,  
João Arildo Sabatke, meu grande herói!

## **AGRADECIMENTOS**

Hoje encerro um ciclo com um imenso sentimento de orgulho e gratidão por concluir essa etapa tão desafiadora da minha formação, carreira e vida. Na ciência, assim como na vida, nada é feito sozinho. Tive o privilégio de compartilhar essa jornada com pessoas incríveis e essenciais, cada uma contribuindo à sua maneira para que eu chegasse até aqui.

Sou imensamente grata ao universo por essa conquista. Agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e ao Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná, pela estrutura oferecida para a realização dos experimentos ao longo desses anos. Aos professores Fabiano Figueiredo e Lia Medeiros, e a todos do Laboratório de Biologia Celular por compartilharem conosco seu laboratório, e a todos os servidores das instituições pelo suporte fundamental.

Tive a oportunidade de conhecer outras instituições e laboratórios onde fui muito bem recebida. Agradeço à Universidade de São Paulo, especialmente à Dra. Denise Fonseca e seus alunos, que se dispuseram a me ajudar a responder uma questão utilizando modelos in vivo, que serão estudados futuramente. À Universidade Federal do Rio de Janeiro, meu carinho e gratidão à Dra. Georgia Atella, que me acolheu de portas abertas em sua casa e no Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas, e à sua querida aluna Karoline Anjos, que gentilmente me auxiliou com experimentos e na construção de ideias no mundo dos lipídios.

Aos professores Dr. Antonio Marcilla e Dra. Alba Cortez, da Universitat de València, minha gratidão imensa por tornarem possível um grande sonho: realizar parte do meu doutorado fora do país. Além de me receberem no laboratório, acolheram-me em seu dia a dia, tornando essa experiência uma das mais especiais da minha vida. Guardarei com carinho cada momento, especialmente as contribuições do Dr. Antonio, a quem tenho profunda admiração. Também agradeço a Christian Sánchez, Carla e Javier, por dedicarem seu tempo para me ajudar.

Ao Instituto Pasteur de Montevideú, onde tive a oportunidade de participar de um curso de parasitologia e conhecer pesquisadores incríveis que ampliaram meus horizontes.

Agradeço a todas as colaborações, em especial ao Dr. Ciro Ribeiro, Dr. Luiz Cláudio Miletti e Dra. Melyssa Negri

Meu agradecimento especial ao querido Israel, da plataforma de microscopia da UFPR, que torceu comigo por cada experimento realizado no confocal, e ao Rodrigo Netto, da plataforma de citometria do ICC, por me acompanhar em muitos e longos dias no citômetro. Vocês foram essenciais para a realização deste estudo.

Ao Dr. Rafael Almeida, por toda ajuda e paciência na realização dos experimentos e análises de proteômica.

Agradeço à Professora Marimélia Porcionatto e à aluna Paula Scanavez pela disposição e pelo auxílio dos experimentos com o TEER. A colaboração de vocês foi muito importante para o sucesso deste e futuros trabalhos.

Ao grupo de pesquisa EVAHPI, minha base como pesquisadora, minha eterna gratidão. Aos amigos e colegas Izadora Rossi, Letícia Bonato, Sarah de Fucio, Beatriz Marquez, Julia Marques e Abel Sana, obrigada pelo incentivo diário, pela lealdade, pelas experiências compartilhadas e pelos incontáveis momentos no laboratório e à mesa do almoço. Lembrarei de tudo com muito carinho.

Ao Bruno Gavinho, que me ensinou a cuidar das *Giardias* e guiou meus primeiros passos nessa jornada, muito obrigada! À minha querida amiga Izadora Rossi, que alegria compartilhar essa trajetória com você! Sua dedicação e inteligência são uma grande inspiração para mim. Obrigada por tanto, e que você conquiste tudo o que sempre sonhou! À minha querida amiga Letícia Bonato, que esteve ao meu lado em diversos experimentos, não apenas torcendo e planejando, mas também colocando a mão na massa e celebrando os resultados. Foi muito especial compartilhar esses anos com você, acompanhar o seu crescimento e ver sua dedicação. Tenho grande admiração por você e desejo que conquiste todos os seus sonhos e chegue aonde deseja.

Ao professor Dr. Marcel Ramirez, fundador do EVAHPI, meu mais profundo agradecimento. Durante esses quatro anos, repeti incontáveis vezes um “muito

obrigada”, e hoje reafirmo essa gratidão. Você foi e sempre será uma grande inspiração para mim. Obrigada por sua orientação, amizade, confiança e por me incentivar a enxergar além das minhas próprias expectativas, despertando o melhor em mim. Admiro profundamente seu trabalho e sou grata por todas as oportunidades que você me proporcionou.

Aos amigos do dia a dia e amigas de longa data – Jordana, Roberta, Izadora e Maria Alice – obrigada por estarem ao meu lado e me presentear com tantas boas lembranças.

Aos meus pais, João Arildo e Ana Paula, que sempre estiveram comigo, com amor, paciência e apoio incondicional, meu mais profundo agradecimento. O esforço de vocês me trouxe até aqui! Essa conquista é nossa!

Ao meu irmão João Pedro, obrigada por sua amizade, pelos conselhos sábios e pelas piadas que tornaram tudo mais leve.

Ao meu companheiro, Luiz Guilherme, essa conquista também é sua. Sem o seu apoio diário, nada disso seria possível. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma, por sua paciência, amor, compreensão e por ser meu maior incentivador. Você é tudo para mim!

Ana Paula, João Arildo, João Pedro e Luiz Guilherme, vocês são meus bem mais precioso. Sem vocês, eu não chegaria até aqui.

Às agências de fomento, pelo suporte financeiro por meio da bolsa de estudos, minha gratidão.

A todos que, de alguma forma, participaram da realização deste trabalho e contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, meu mais sincero muito obrigada!

“O parasita e o hospedeiro não são entidades separadas, mas fazem parte de uma mesma história evolutiva.”

— *Richard Dawkins*

## RESUMO

*Giardia intestinalis* é um protozoário flagelado responsável pela giardíase, uma das infecções diarreicas intestinais mais comuns mundialmente, especialmente em regiões com saneamento inadequado. A interação entre *G. intestinalis* e as células do hospedeiro envolve mecanismos complexos, incluindo a liberação de vesículas extracelulares (VEs), partículas de bicamada lipídica que atuam na comunicação celular via transporte de biomoléculas. Este estudo investigou os mecanismos diferenciais de “uptake” de VEs derivadas de *G. intestinalis* (gEVs), das células hospedeiras (hEVs) e das vesículas formadas durante a interação parasita-hospedeiro (intEVs) em células intestinais Caco-2. Os resultados demonstraram que as intEVs são internalizadas mais rapidamente. Para elucidar as vias de internalização, foram aplicados diversos inibidores de endocitose, incluindo MDC, genisteína, EIPA e Dynasore. As análises revelaram que as gEVs utilizam predominantemente vias dependentes de dinamina e clatrina, sendo independentes de caveolas e balsas lipídicas, mas moduladas por sinalização de tirosina quinase e macropinocitose. Em culturas 3D de Caco-2 e HT-29, a interação com VEs resultou na quebra da barreira epitelial, evidenciada pela redução na resistência elétrica transepitelial (TEER) e aumento da permeabilidade paracelular. Análises ômicas revelaram diferenças marcantes entre os subtipos de VEs. A lipidômica indicou uma maior abundância de esfingolipídios e colesterol nas intEVs, sugerindo um papel na modulação da fusão e internalização dessas vesículas. A proteômica demonstrou que, nas primeiras 1 hora de interação, as intEVs apresentaram maior expressão de proteínas associadas à adesão e remodelamento do citoesqueleto, como integrinas e actinas, enquanto após 24 h, foram observadas proteínas relacionadas à evasão imunológica e modulação de resposta inflamatória, como galectinas e proteínas de choque térmico. Por outro lado, as gEVs mostraram enriquecimento em proteínas de virulência nas fases iniciais, enquanto as hEVs apresentaram proteínas associadas à resposta ao estresse celular em 24 h. Estas descobertas oferecem novos alvos terapêuticos para mitigar os efeitos da giardíase e aprofundam a compreensão do papel das VEs na modulação da barreira intestinal e na persistência do parasita.

Palavras-chave: *Giardia intestinalis*; Vesículas extracelulares; Interação patógeno-hospedeiro; Uptake; Mecanismos de endocitose.

## ABSTRACT

*Giardia intestinalis* is a flagellated protozoan responsible for giardiasis, one of the most common intestinal diarrheal infections worldwide, especially in regions with inadequate sanitation. The interaction between *G. intestinalis* and host cells involves complex mechanisms, including the release of extracellular vesicles (EVs), lipid bilayer particles that act in cellular communication via the transport of biomolecules. This study investigated the differential mechanisms of “uptake” of *G. intestinalis*-derived EVs (gEVs), host cell-derived EVs (hEVs), and vesicles formed during the parasite-host interaction (intEVs) in Caco-2 intestinal cells. The results demonstrated that intEVs are internalized more rapidly. To elucidate the internalization pathways, various endocytosis inhibitors were applied, including MDC, genistein, EIPA, and Dynasore. The analyses revealed that gEVs predominantly utilize dynamin- and clathrin-dependent pathways, being independent of caveolae and lipid rafts, but modulated by tyrosine kinase signaling and macropinocytosis. In 3D cultures of Caco-2 and HT-29, interaction with EVs resulted in the disruption of the epithelial barrier, evidenced by a reduction in transepithelial electrical resistance (TEER) and increased paracellular permeability. Omic analyses revealed striking differences between the EV subtypes. Lipidomics indicated a higher abundance of sphingolipids and cholesterol in intEVs, suggesting a role in the modulation of fusion and internalization of these vesicles. Proteomics showed that, within the first hour of interaction, intEVs exhibited higher expression of proteins associated with adhesion and cytoskeletal remodeling, such as integrins and actins, while after 24 hours, proteins related to immune evasion and modulation of inflammatory response, such as galectins and heat shock proteins, were observed. In contrast, gEVs showed enrichment in virulence proteins in the early stages, while hEVs displayed proteins associated with cellular stress response after 24 hours. These findings offer new therapeutic targets to mitigate the effects of giardiasis and deepen the understanding of the role of EVs in modulating the intestinal barrier and parasite persistence.

Keywords: *Giardia intestinalis*; Extracellular vesicles; Host-Pathogen interaction; “uptake”; Endocytosis mechanism.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FORMAS EVOLUTIVAS E CICLO BIOLÓGICO DE <i>G. INTESTINALIS</i>	21
FIGURA 2 – VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	26
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DO DESENHO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO DURANTE A TESE	45
FIGURA 4 – CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS DE DIFERENTES MODELOS	46
FIGURA 5 - ESTÍMULO DE CÁLCIO NA BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>G. INTESTINALIS</i>	47
FIGURA 6 – DINÂMICA DA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES POR <i>G. INTESTINALIS</i>	47
FIGURA 7 – BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS	48
FIGURA 8 – CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS DE INTERAÇÃO ENTRE PARASITA E HOSPEDEIRO ( <i>INTEV</i> )	49
FIGURA 9 - RASTREAMENTO DA INTERNALIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÉLULAS CACO-2	50
FIGURA 10 - INTERNALIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES POR CÉLULAS CACO-2 SÃO DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO	51

FIGURA 11 – VESÍCULAS DE INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA SÃO RAPIDAMENTE INTERNALIZADAS POR CÉLULAS INTESTINAIS .....	52
FIGURA 12 – O “UPTAKE” DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>G. INTESTINALIS</i> É DINAMINA-DEPENDENTE EM CÉLULAS CACO-2 .....	53
FIGURA 13 – O “UPTAKE” DE VESÍCULAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> É DEPENDENTE DE CLATRINA E MACROPINOCITOSE EM CÉLULAS CACO-2 .....	54
FIGURA 14 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E IMPACTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E CRESCIMENTO DO PARASITA .....	55
FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES) POR <i>G. INTESTINALIS</i> EM RESPOSTA ÀS VES EXÓGENAS .....	56
FIGURA 16 – EFEITO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES) EXÓGENAS NA LIBERAÇÃO DE VES POR <i>G. INTESTINALIS</i> .....	57
FIGURA 17 – <i>G. INTESTINALIS</i> INTERNALIZA PREFERENCIALMENTE VES PRÓPRIAS .....	58
FIGURA 18 – O “UPTAKE” DE VESÍCULAS EXTRACELULARES POR <i>G. INTESTINALIS</i> OCORRE PELO MECANISMO DE DINAMINA-DEPENDENTE .....	59
FIGURA 19 – COMUNICAÇÃO PARASITA-PARASITA MEDIADA POR VESÍCULAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> .....	60
FIGURA 20 – A INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE VES REDUZ A ADESÃO DE <i>G. INTESTINALIS</i> ÀS CÉLULAS HOSPEDEIRAS .....	61

FIGURA 21 – DINÂMICA DE INCORPORAÇÃO DE LIPÍDIOS DURANTE A INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO (LEVS) EM 1 E 24 H	62
FIGURA 22 – DINÂMICA DE INCORPORAÇÃO DE LIPÍDIOS DURANTE A INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO (SEVS) EM 1 E 24 H	63
FIGURA 23 - PERFIL LIPÍDICO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES GRANDES (LEVS), DERIVADAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> (GEV), CÉLULAS HOSPEDEIRAS (HEV) E DA INTERAÇÃO ENTRE AMBOS (INTEV) EM 1 E 24 DE INCUBAÇÃO	64
FIGURA 24 – PERFIL LIPÍDICO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUENAS (SEVS), DERIVADAS DE <i>G. INTESTINALIS</i> (GEV), CÉLULAS HOSPEDEIRAS (HEV) E DA INTERAÇÃO ENTRE AMBOS (INTEV) EM 1 E 24 DE INCUBAÇÃO	65
FIGURA 25 – COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EM 1 E 24 H	67
FIGURA 26 – ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A GEVS EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (1 E 24 H)	68
FIGURA 27 – ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A HEVS EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (1 E 24 H)	68
FIGURA 28 – ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A INTEVS EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (1 E 24 H)	69
FIGURA 29 – DISTRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS GEVS E INTEVS EM 1 E 24 H	70

FIGURA 30 – NÍVEL DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NAS GEV, HEV E INTEV AOS 1 E 24 H, POR MEIO DE MAPA DE CALOR .....	75
FIGURA 31 – CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS CÉLULAS CACO-2 CULTIVADAS POR 21 DIAS EM UM SISTEMA TRIDIMENSIONAL .....	77
FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL NA PRESENÇA DE <i>G. INTESTINALIS</i> E DE SUAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	78
FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL APÓS TRATAMENTO COM <i>G. INTESTINALIS</i> E VESÍCULAS EXTRACELULARES DO PARASITA EXTRACELULARES DO PARASITA ATRAVES DO COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE APARENTE (PAPP) .....	79
FIGURA 34 – LIBERAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A FORMAÇÃO DO EPITÉLIO INTESTINAL .....	80
FIGURA 35 – AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA EPITELIAL INTESTINAL APÓS TRATAMENTO COM <i>G. INTESTINALIS</i> E VESÍCULAS EXTRACELULARES DO PARASITA.....	81
FIGURA 36 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE EPITELIAL AO LONGO DO TEMPO E DEFINIÇÃO DO CONTROLE POSITIVO .....	82
FIGURA 37 – AVALIAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR EM MEMBRANAS TRATADAS COM GELATINA 1% E PLL AO LONGO DA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS CACO-2.....	83
FIGURA 38 – DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS CACO-2 COM PRIVAÇÃO DE MEIO NO COMPARTIMENTO APICAL .....	84

FIGURA 39 – CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR CÉLULAS CACO-2 ISOLADAS E DA CO-CULTURA CACO-2/HT-29 NO 10º DIA DE DIFERENCIAÇÃO .....	85
FIGURA 40 – EFEITO DA INFECÇÃO POR <i>G. INTESTINALIS</i> E DE SUAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (GEVS) NA PERMEABILIDADE EPITELIAL E NA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS PELAS CÉLULAS CACO-2 .....	86
FIGURA 41 – EFEITO DA INFECÇÃO POR <i>G. INTESTINALIS</i> E DE SUAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (GEVS) NA PERMEABILIDADE EPITELIAL E NA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EM CO-CULTURA DE CACO-2 E HT-29 .....	87
FIGURA 42 – NÍVEIS RELATIVOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS CACO-2 APÓS INCUBAÇÃO COM DIFERENTES VESÍCULAS EXTRACELULARES (GEV, HEV, INTEV) E <i>G. INTESTINALIS</i> .....	88

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DA CÉLULA HOSPEDEIRA (CACO-2) APÓS 1 E 24 DE INTERAÇÃO COM <i>G. INTESTINALIS</i> .....	72
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- ATCC - American Type Culture Collection
- CFSE - Diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster
- DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGTA - Ácido etilenoglicol tetra-acético
- ESCRT - Complexo de endereçamento endossomal necessário ao transporte
- Caco-2 - Adenocarcinoma colon humano
- HT-29 - Adenocarcinoma colon humano
- ILV - Vesículas intraluminais
- MOI - Multiplicity of infection
- MVB - Corpos multivesiculares
- NTA - Nanoparticle Tracking Analysis (Análise de Rastreamento de Nanopartículas)
- P - Probabilidade de significância
- PBS - Phosphate-buffered saline solution (inglês)
- PES - Produtos Excretórios-Secretórios
- PKH-26 - Red Fluorescent Cell Linker (inglês)
- RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium (inglês)
- SAB - Soro adulto bovino
- VEEs - Vesículas específicas de encistamento
- LEVs - Vesículas extracelulares grandes/ large extracellular vesicles
- SEVs - Vesículas extracelulares pequenas / small extracellular vesicles
- VEs - Vesículas extracelulares
- WT - Wild-type (tipo selvagem, com genótipo natural)
- TEER - Transepithelial Electrical Resistance
- Papp – Permeabilidade aparente
- PFA 4% - Paraformaldeído 4%
- IECS – Intestinal Epithelial Cell System (Células Epiteliais Intestinais)
- iNOS – Inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase Induzível)

PAD – Peptidil Arginina Desiminase (Peptidyl Arginine Deiminase)

MBCD – Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (Metil- $\beta$ -Ciclodextrina)

sRNA – Small RNA (RNA pequeno)

tRNA – Transfer RNA (RNA transportador)

MDC – Monodansylcadaverine (Monodansilcadaverina)

CME – Clathrin-Mediated Endocytosis (Endocitose Mediada por Clatrina)

MVs – Microvesicles (Microvesículas)

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

ZO-1 – Zona Occludens-1 (Proteína da Junção Oclusiva 1)

gEV – Giardia-Derived Extracellular Vesicles (Vesículas Extracelulares Derivadas de *Giardia*)

intEV – Interaction Extracellular Vesicles (Vesículas Extracelulares de Interação)

hEV – Host-Derived Extracellular Vesicles (Vesículas Extracelulares Derivadas do Hospedeiro)

VSPs – Variant-Specific Surface Proteins (Proteínas de Superfície Específicas de Variantes)

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada

$\Sigma$  - Somatório de números

$\mu\text{g}$  - Microgramas

$\mu\text{L}$  - Microlitros

$\mu\text{M}$  – Micromolar

$\text{Ca}^{2+}$ - Íon de cálcio Ca

M – Molar

$\text{mg/mL}$  - Miligramas/mililitros

$\text{mL}$  – Mililitros

$\text{mM}$  – Milimolar

$\text{nm}$  – Nanômetro

$^{\circ}\text{C}$  - Graus Celsius

$^{\text{TM}}$  - Marca comercial

$\text{v/v}$  -  $\text{mL}$  soluto/ $100 \text{ mL}$  solução final

$\text{xg}$  - Unidade de força relativa centrifugacional

$\text{CaCl}_2$  - Cloreto de cálcio

$\text{CO}_2$  - Dióxido de carbono

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	17
Objetivo geral .....	17
Objetivos específicos .....	17
1.2 JUSTIFICATIVA.....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 <i>G. INTESTINALIS</i> E GIARDÍASE .....	19
2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA .....	22
2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	23
Biogênese de vesículas extracelulares .....	23
“Uptake” de vesículas extracelulares .....	24
Interação patógeno-hospedeiro através das VEs .....	27
2.4 CULTURAS DE CÉLULAS 2D E 3D.....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 ISOLADOS DE <i>G. INTESTINALIS</i> E CULTURA DE CÉLULAS CACO-2.....	32
3.2 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES).....	32
3.3 BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	33
Biogênese de gEVs .....	33
Biogênese de hEVs .....	33
Biogênese de intEVs .....	33
3.4 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS VES .....	34
3.5 MARCAÇÃO DE VES.....	34
3.6 ENSAIO DE “UPTAKE” DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS.....	35
3.7 INIBIÇÃO DO “UPTAKE” EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS .....	35
3.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA NA PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE .....	36
3.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS CACO-2 NA PRESENÇA DE VES	

3.10 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>G. INTESTINALIS</i> NA PRESENÇA DE VES	36
3.11 RESPOSTA AUTOLOGA DE <i>G. INTESTINALIS</i> NA LIBERAÇÃO DE VES AO ESTÍMULO EXÓGENO DE VES	37
3.12 “UPTAKE” DE VES POR <i>G. INTESTINALIS</i>	37
3.13 INIBIÇÃO DO “UPTAKE” DE VES EM <i>G. INTESTINALIS</i>	37
3.14 ENSAIO COMPARATIVO DE COMUNICAÇÃO CELULAR PELA TRANSFERENCIA DE SECRETOMA TOTAL E LEVS EM <i>G. INTESTINALIS</i>	38
3.15 ENSAIO DE ADESÃO DE <i>G. INTESTINALIS</i> NA PRESENÇA DE VES	38
3.16 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS	39
3.17 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DE ALTO DESEMPENHO (HPTLC)	39
3.18 ENSAIO DE <i>PULSE CHASE</i> DE UTILIZAÇÃO DE LIPÍDIOS NAS LEVS DE TROFOZOÍTOS DE <i>G. INTESTINALIS</i> E CÉLULAS CACO-2, USANDO PRECURSORES LIPÍDICOS (PALMITATO- <sup>3</sup> H INCORPORADO À BSA ( <sup>3</sup> H-FA-BSA)	40
3.19 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA (TLC)	41
3.20 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA PROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSA	41
3.21 ANÁLISE DE DADOS	42
3.22 CULTURA CELULAR EM MODELO 3D	42
3.23 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSEPITELIAL – TEER	43
3.24 PERMEABILIDADE PARACELULAR	43
3.25 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	44
3.26 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>45</b>
4.1 BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS DURANTE A INTERAÇÃO PATOGENO HOSPEDEIRO	45
Biogênese de VEs de <i>G. intestinalis</i> (gEV)	46
Biogênese de VEs em células hospedeiras (hEV)	48
Biogênese de VEs durante a interação parasita célula-hospedeira	49
4.2 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE “UPTAKE” EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS	49

Análise do “uptake” de vesículas extracelulares em células Caco-2 .....	49
“uptake” diferencial das vesículas de interação (intEVs) .....	51
Caracterização dos mecanismos de endocitose no “uptake” de vesículas extracelulares de <i>G. intestinalis</i> em células hospedeiras .....	52
4.3 COMUNICAÇÃO ENTRE PARASITAS MEDIADA POR VESÍCULAS .....	55
4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ASSOCIADOS A INTERAÇÃO PARASITO CÉLULA HOSPEDEIRA.....	61
Incorporação de lipídios (Palmitato).....	61
Perfil lipídico em <i>G. intestinalis</i> e vesículas extracelulares da interação parasita-hospedeiro .....	63
Perfil proteômico das vesículas de <i>G. intestinalis</i> e da interação parasita-hospedeiro	65
4.4.1.1 Proteômica das vesículas extracelulares .....	65
4.4.1.2 Análise qualitativa das proteínas obtidas de vesículas extracelulares.....	65
4.4.1.3 Funcionalidade das proteínas das VEs durante a interação parasita-hospedeiro .....	66
4.4.1.4 Análise do perfil de expressão proteica das vesículas extracelulares .....	70
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO EPITÉLIO INTESTINAL EM CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS CACO 2 (3D) .....	75
4.5.1 Formação do epitélio intestinal em 21 dias e caracterização das vesículas extracelulares .....	75
4.5.2 Impacto de <i>G. intestinalis</i> e suas vesículas extracelulares na barreira intestinal	76
4.5.3 Resposta a concentrações elevadas de vesículas extracelulares.....	77
4.5.4 Dinâmica temporal de liberação de vesículas durante a formação do epitélio intestinal .....	78
4.5.5 Avaliação da permeabilidade celular após exposição a <i>G. intestinalis</i> e suas vesículas extracelulares.....	79
4.5.6 Otimização do método para avaliar a permeabilidade celular do epitélio.....	80
4.5.7 Avaliação da formação e maturação do epitélio intestinal ao longo do tempo .	81
4.5.8 Otimização do modelo de diferenciação celular com interface ar-líquido.....	82

4.5.9 Impacto da co-cultura na liberação de vesículas extracelulares .....	83
4.5.10 Impacto da co-cultura de <i>G. intestinalis</i> e suas vesículas extracelulares na permeabilidade celular .....	84
4.6 EFEITO DAS VESÍCULAS NA INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS CACO-2.....	86
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
5.1 DIFERENTES TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES SÃO PRODUZIDOS DURANTE A INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA .....	88
5.2 A LIBERAÇÃO DE LEVS DE <i>G. INTESTINALIS</i> E DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS É DEPENDENTE DE CÁLCIO .....	89
5.3 DINÂMICA DO “UPTAKE” DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA .....	89
5.4 A PARTICIPAÇÃO DAS VES NA COMUNICAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA DEPENDE DE ENDOCITOSE E PODE SER BLOQUEADA POR INIBIDORES.....	90
5.5 A PARTICIPAÇÃO DAS VES NA COMUNICAÇÃO PARASITA-CÉLULA .....	93
5.6 ANÁLISE LIPÍDICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	95
5.7 ANÁLISE PROTEICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	98
5.8 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA INTEGRIDADE DA BARREIRA INTESTINAL EM MODELOS 3D .....	100
5.9 MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS CACO-2 POR VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	103
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>107</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEINAS OBTIDAS DAS VESICULAS EXTRACELULARES.....</b>	<b>122</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Giardia intestinalis* (também conhecida como *G. lamblia* ou *G. duodenalis*) é um dos parasitas flagelados intestinais mais comuns, responsável por causar giardíase, uma das doenças diarreicas parasitárias mais prevalentes mundialmente (Adam, 2001; Mekonnen & Ekubagewargies, 2019; Certad et al., 2017). As infecções parasitárias intestinais representam um grande desafio à saúde pública, afetando cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo e resultando em quadros clínicos sintomáticos em aproximadamente 450 milhões de indivíduos (Okyay et al., 2004). Predominantes em países em desenvolvimento e em regiões socio economicamente desfavorecidas, contribuindo para um elevado número de óbitos anuais (Hailegebriel, 2017).

Este protozoário flagelado é transmitido pela ingestão de água ou alimentos contaminados contendo cistos, a forma infectiva do parasita, ou pelo contato fecal-oral direto. Após a ingestão, os cistos se transformam em trofozoítos dentro do intestino do hospedeiro, os quais se aderem fortemente ao epitélio intestinal levando a danos intestinais e diarreia (Adam, 2001; Einarsson; Ma'ayeh; Svärd, 2016). Embora muitos casos sejam assintomáticos, a giardíase aguda pode manifestar sintomas que normalmente se resolvem em duas a quatro semanas; no entanto, condições crônicas podem se desenvolver para resistência a medicamentos ou outros fatores ainda não bem compreendidos (Motta et al., 2002). A patogênese da doença é multifatorial, entre estes, a capacidade do parasita de aderir, colonizar e romper o epitélio intestinal se destaca como um dos contribuintes mais importantes para os sintomas gastrointestinais. Apesar da eficácia, os agentes quimioterápicos contra *G. intestinalis* demonstraram falhas em até 5%-40% dos casos. Além disso, a resistência tem sido associada em doenças crônicas (Argüello-García et al., 2020).

*G. intestinalis* foi inicialmente descrita por Van Leeuwenhoek em 1681. Esse protozoário apresenta um metabolismo anaeróbico e uma biologia peculiar em comparação com outros eucariotos, caracterizando-se pela ausência de mitocôndrias e por um complexo de endomembranas pouco desenvolvido (Adam, 2021).

Estudos recentes têm destacado o papel das vesículas extracelulares (VEs) na facilitação do processo de adesão celular (Evans-Osses et al., 2017). As VEs são nanopartículas envoltas por uma bicamada lipídica e classificadas em dois grupos com base em seu tamanho e biogênese: exossomos e microvesículas. Exossomos, com menos de 150 nm, derivam do sistema endossomal como vesículas intraluminais

dentro dos corpos multivesiculares, enquanto microvesículas, com diâmetro entre 150 e 1000 nm, são formadas do brotamento da membrana plasmática (Colombo, Raposo e Théry, 2014). Essas VEs carregam diversas biomoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares derivados célula de origem, desempenhando um papel crucial na comunicação intercelular.

Entender os mecanismos pelos quais as VEs são internalizadas pelas células hospedeiras é crucial para o desenvolvimento de novas terapias. O “uptake”, o processo pelo qual as células internalizam VEs, continua sendo um assunto de estudo intenso. Embora a endocitose seja proposta como a principal via para internalização de VEs por células hospedeiras (Svensson et al., 2013), outros mecanismos podem ser utilizados como: ligação a receptores na superfície, macropinocitose, fagocitose ou fusão direta com a membrana plasmática, são vias exploradas para o “uptake” de VEs (Mulcahy, Pink e Carter, 2014).

Neste trabalho, investigamos os mecanismos de internalização (“uptake”) e comunicação das VEs durante a interação entre *G. intestinalis* e células intestinais Caco-2. Analisamos a natureza lipídica e proteica dessas vesículas e estabelecemos um modelo de cultura celular 3D para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra giardíase.

## 1.1 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Compreender os mecanismos de internalização (“uptake”) das vesículas extracelulares (VEs) de *G. intestinalis* pelas células hospedeiras e avaliar seus efeitos fenotípicos, com o objetivo de desenvolver estratégias para bloquear ou inibir a infecção.

### Objetivos específicos

Caracterizar a biogênese das VEs liberadas por *G. intestinalis*, células hospedeiras (Caco-2) e durante a interação parasito-hospedeiro, incluindo a identificação de subpopulações e composição molecular;

Determinar os mecanismos de internalização (“uptake”) das VEs em células hospedeiras, identificando as vias endocíticas específicas envolvidas (clatrina, caveolina, macropinocitose, fusão direta) por meio de inibidores específicos de endocitose;

Comparar a internalização de diferentes tipos de VEs – vesículas originadas do parasito *G. intestinalis* (gEV), vesículas liberadas pelas células Caco-2 ou células hospedeiras (hEV) e vesículas de interação entre *G. intestinalis* e células Caco-2 (intEV), em culturas de células Caco-2 em sistemas 2D, avaliando possíveis diferenças na cinética e eficiência de “uptake”;

Avaliar o conteúdo lipídico e proteico das diferentes VEs por meio de espectrometria de massa e HTLC, identificando biomoléculas associadas à virulência e interação patógeno-hospedeiro;

Investigar o impacto das VEs na integridade da barreira epitelial intestinal, analisando alterações fenotípicas em culturas 3D de células Caco-2;

Explorar estratégias terapêuticas baseadas no bloqueio do “uptake” das VEs, testando inibidores endocíticos e avaliando o efeito sobre a adesão e infecção de *G. intestinalis* em células hospedeiras.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

*G. intestinalis* libera vesículas extracelulares (VEs) que aumentam a adesão às células hospedeiras. Essas VEs contêm diversas proteínas associadas à virulência e à interação patógeno-hospedeiro, contribuindo significativamente para a patogênese da doença. A infecção por *G. intestinalis* é caracterizada principalmente por episódios frequentes de diarreia autolimitada. No entanto, em contextos de pobreza, a infecção pode se tornar mais grave, estando associada à desnutrição, à resistência aos tratamentos convencionais e, em casos extremos, à morte, especialmente em crianças. Diante dessas evidências, nossa proposta é compreender como as vesículas liberadas pelo parasita interagem e são internalizadas pelas células hospedeiras, com o objetivo de desenvolver estratégias que bloqueiem e/ou inibam o efeito dessas vesículas, impedindo a infecção por *G. intestinalis*. O avanço no conhecimento sobre a biologia celular e a patogênese do parasita poderá contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas mais eficazes para o controle da doença, especialmente em populações vulneráveis.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *G. INTESTINALIS* E GIARDÍASE

*Giardia intestinalis* (sin. *G. duodenalis* ou *G. lamblia*) é um protozoário anaeróbio, microaerófilo unicelular, flagelado e eucariótico. É o agente etiológico da giardíase, conhecida como diarreia do viajante, uma das infecções diarreicas parasitárias mais comuns mundialmente, afetando milhões de pessoas (Ankarklev et al., 2010), estima-se que ocorram cerca de 280 milhões de novos casos anualmente (Lane & Lloyd, 2002), com cerca de 500.000 mortes registradas a cada ano (Hajare, Chekol & Chauhan, 2022). Esse parasita infecta o intestino de diversos vertebrados, incluindo aves, anfíbios e mamíferos, como os seres humanos (Adam, 2021). A doença é mais prevalente em países em desenvolvimento, onde a precariedade das condições sanitárias, especialmente no tratamento de água e esgoto, favorece sua disseminação (Einarsson, Ma'ayeh, Svärd, 2016). Devido ao impacto significativo dessa doença em regiões com baixa condição socioeconômica, a Organização Mundial da Saúde a incluiu a giardíase no grupo de Doenças Negligenciadas (Savioli et al., 2006).

*G. intestinalis* apresenta uma grande diversidade genética e é dividido em oito assemblages (A – H), que, embora morfologicamente idênticas, possuem diferenças genéticas significativas. Os genótipos A e B são os principais responsáveis pelas infecções em humanos (Cacciò e Ryan, 2008).

O parasito apresenta um ciclo biológico simples, com dois estágios evolutivos: trofozoítos e cistos. Os trofozoítos são a forma replicativa e não infecciosa, presentes no intestino delgado, enquanto os cistos representam a forma resistente, permitindo a sobrevivência do parasita em diferentes condições ambientais (Adam, 2001). A infecção inicia-se com a ingestão de cistos por meio de água ou alimentos contaminados, ou pelo contato direto fecal-oral. No estômago, a acidez ativa a excitação, onde o cisto se rompe e libera 2 excizoítos, que rapidamente originam 2 trofozoítos binucleados móveis no intestino delgado (Adam, 2001; Bernander; Palm & Svard, 2001). Esses trofozoítos colonizam a mucosa intestinal, multiplicam-se e, ao serem expostos a fatores como alta concentração de bile e privação de colesterol, iniciam o encistamento. Durante esse processo, os trofozoítos perdem a motilidade e secretam proteínas da parede cística (CWP), formando cistos resistentes que no intestino grosso e são eliminados nas fezes, permitindo a continuidade do ciclo (Luján, Mowatt & Nash, 1997; Lauwaet et al., 2007; Escobedo et al., 2014).

Em relação à biologia do parasito, *G. intestinalis* foi inicialmente considerada um dos primeiros eucariotos divergentes devido à ausência de organelas típicas, como mitocôndrias, complexo de Golgi e peroxissomos. No entanto, estudos sugerem que essa característica é resultado de uma perda secundária evolutiva dessas estruturas, e não de uma divergência de um ancestral eucarionte anterior à aquisição dessas organelas (Embley & Hirt, 1998; Ye et al., 2017; Cernikova et al., 2018). Este protozoário que apresenta organelas organizadas em pares, incluindo dois núcleos diploides, mitossomos (estruturas semelhantes a mitocôndrias) e o disco ventral (Argüello-García et al., 2020), além de 4 pares de flagelos. O disco ventral, composto por microtúbulos e microfilamentos, desempenha um papel crucial na adesão do parasita ao hospedeiro. O metabolismo energético de *Giardia* é anaeróbico, sem a presença de fosforilação oxidativa mediada por citocromo, sendo a glicose a principal fonte de energia para o organismo (Adam, 2021). O parasita também apresenta um sistema simplificado de endomembranas, composto por compartimentos como o retículo endoplasmático, vesículas periféricas (VP) e vesículas específicas de encistamento (VEE), essas últimas observadas apenas em parasitos em processo de encistamento (Cernikova et al., 2018; Midlej et al., 2019). Além disso, o parasito utiliza um mecanismo de variação antigênica, no qual modifica a expressão de suas proteínas de superfície (VSPs), permitindo a persistência da infecção e facilitando a reinfecção do hospedeiro (Prucca et al., 2008).

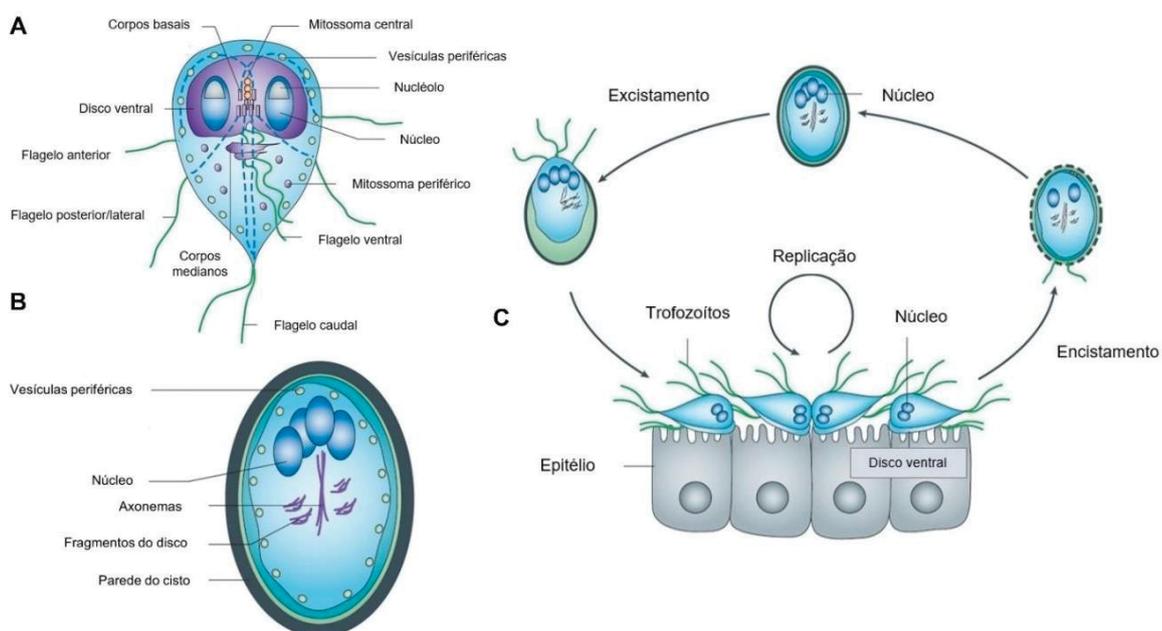
A prevalência da giardíase varia conforme o nível de desenvolvimento do país. Em países desenvolvidos, estima-se que a infecção atinja 2-5% da população, enquanto em países em desenvolvimento, essa taxa pode chegar a 20-30% (Sousa et al., 2006). A infecção por *Giardia* é uma das principais causas de diarreia, sendo mais frequente em crianças menores de dois anos (Lalle, 2010). Estudos indicam que, entre crianças de 12 a 24 meses em países em desenvolvimento, *Giardia* é o segundo agente etiológico mais comum, ficando atrás apenas de *Campylobacter* spp. (Plattsmills et al., 2015). No Brasil, a infecção está presente em todas as regiões, mas não há levantamentos nacionais sobre sua prevalência. Estudos locais apontam taxas que variam de 26,9% a 78,3%, dependendo da região analisada (De Carvalho et al., 2006; Pittner et al., 2007; Coelho et al., 2017).

O diagnóstico da giardíase é realizado principalmente pela detecção de cistos nas fezes por microscopia, com técnicas de coloração para facilitar a identificação (Koehler et al., 2014). Métodos mais avançados incluem microscopia de fluorescência,

imunocromatografia, ELISA e a pesquisa de anticorpos, que apresenta menor sensibilidade e especificidade (Paniker, 2013). A PCR tem sido utilizada para identificação dos diferentes genótipos de *Giardia spp*, auxiliando no estudo epidemiológico da infecção (Feng & Xiao, 2011), principalmente na análise de águas contaminadas.

O tratamento da doença é baseado no uso de agentes antiparasitários. Foi iniciado com metronidazol, muito tóxico e onde houve relatos de resistência. Posteriormente foi estendido para tinidazol, albendazol e nitazoxanida. A escolha do medicamento depende de fatores como idade do paciente, presença de comorbidades e tolerância ao fármaco (Paniker, 2013). Embora amplamente utilizados, esses medicamentos são frequentemente associados a efeitos colaterais adversos e casos de resistência parasitária (Leitsch, 2015; Argüello-García et al., 2020), o que pode comprometer sua eficácia terapêutica.

Figura 1 – Formas evolutivas e ciclo biológico de *G. intestinalis*



A) Morfologia dos trofozoítos e (B) cistos de *G. intestinalis*. (C) Representação do ciclo biológico do parasita nas suas formas evolutivas. Figura adaptada de Ankarklev et al., 2010.

## 2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA

As manifestações clínicas da *G. intestinalis* são muito variáveis entre os indivíduos infectados e costuma ser assintomática na maioria dos casos (Solomons, 1982). Dentre as características clínicas da infecção, as que se destacam são: dor abdominal, náusea, vômito, perda de peso (Eckmann, 2003), inchaço, diarreia com ou sem a síndrome de má absorção, disbiose, desidratação, má digestão, flatulência, esteatorréia, urticária e sensibilidade contra os antígenos alimentares (Prisco et al., 1998). A giardíase tende a ser autolimitante em indivíduos imunocompetentes, entretanto, em crianças, a infecção aguda pode ocasionar anorexia, falhas no crescimento físico e cognitivo e no estado nutricional (Berkman et al., 2002). A fisiopatologia da giardíase ocorre quando trofozoítos se aderem no epitélio intestinal. Além disso, a infecção é multifatorial e envolve fatores ligados ao parasito e hospedeiro. A doença também pode estar associada a distúrbios gastrointestinais crônicos como a Síndrome do Intestino Irritado (SII), aliados ou não a patologias extra intestinais ainda que os parasitos permaneçam no interior do trato gastrointestinal (Dizdar, Gilja & Hausken, 2007; Cotton, Beatty & Buret, 2011).

Paralelamente à adesão dos trofozoítos as células epiteliais, ocorre uma série de eventos os quais se interligam na produção da diarreia, assim, incluímos a alta taxa de apoptose dos enterócitos, a disfunção da barreira intestinal, o encurtamento da borda em escova das microvilosidades, acompanhados ou não da atrofia das vilosidades, as deficiências de dissacaridases, a ativação de linfócitos do hospedeiro, a hipersecreção de ânion e o aumento do trânsito intestinal, exemplificam os estágios da disfunção intestinal (Buret, Gall & Olson, 1991; Wolfe, 1992; Cotton et al., 2011). O aumento da permeabilidade intestinal mediado pelo parasito é resultado das alterações ocorrentes nos complexos juncionais apicais, que inclui interrupções de F-actina, ZO-1, claudina-1 e  $\alpha$ -actina, um dos componentes do anel de actomiosina que regula o fluxo paracelular (Scott et al., 2004; Troeger et al., 2007; Maia-Brigagão, Morgado-díaz & Souza, 2012). Durante a infecção pode ocorrer a redução da área total de absorção, seguida ou não da atrofia das vilosidades, o que representa um fator importante para diarreia via má-absorção de vitamina B12, ferro, sódio, zinco, vitaminas lipossolúveis e má-digestão (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011). De acordo com Troeger e colaboradores (2007) pacientes com giardíase crônica são caracterizados por apresentam redução na área da superfície duodenal e este processo, assim como a deficiência de dissacaridases microvilares são mediados por

linfócitos CD8+ ativados, corroborando com a hipótese de que a imunopatologia mediada pela *Giardia* ocorre secundariamente ao rompimento da barreira intestinal, aliados ou não à presença de toxinas vindas do parasito (Scott, Yu & Buret, 2004).

## 2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES

### Biogênese de vesículas extracelulares

Vesículas extracelulares (VEs) são nanopartículas compostas por uma bicamada lipídica, liberadas das células para o ambiente extracelular em diferentes organismos e tipos de células (Colombo, Raposo e Théry, 2014; Marcilla et al. 2012). De acordo as diretrizes do MISEV, minimal information for studies of extracellular vesicles - 2018, as VEs são classificadas de acordo com seu tamanho e biogênese em: microvesículas ou ectossomos, exossomos e corpos apoptóticos (Théry et al., 2018). Os exossomos, ou small extracellular vesicles (SEVs), possuem um diâmetro inferior a 150 nm e são vesículas intraluminais (VILs) formadas durante a maturação dos corpos multivesiculares (CMVs). Esse processo envolve o complexo ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), um conjunto de proteínas que coordenam o brotamento da membrana endossomal para formar as vesículas dentro dos CMV (Colombo et al. 2014). Uma vez formados, os exossomos são liberados para o espaço extracelular fusionando os CMV com a membrana plasmática. Já as microvesículas, ou large extracellular vesicles (LEVs), geralmente têm diâmetro entre 150 a 1000 nm, e se formam através do brotamento direto da membrana plasmática. Esse processo é desencadeado pelo aumento de cálcio intracelular, ativando a calpaína e promovendo a clivagem da actina. Além disso, a scramblase é ativada, enquanto as flipases e flopases são inibidas (Akers et al. 2013). Isso facilita a formação de protuberâncias na membrana, que se soltam, promovendo a formação dessas vesículas.

Nas últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado que as VEs atuam como um sistema de comunicação célula a célula envolvido na transferência de biomoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares, entre células produtoras e receptoras, podendo modular o comportamento da célula receptora e modificar processos fisiológicos e patológicos (Raposo & Stoorvogel, 2013; El Andaloussi et al., 2013; Rädler et al., 2023).

Especialmente em doenças crônicas como no câncer, um crescente número de evidências indica que as VEs exercem funções essenciais na propagação tumoral. Por exemplo, no estabelecimento de um nicho pré-metastático ou metastático (Becker

et al., 2016; Sohal & Kasinski, 2023) e promoção a angiogênese (Sánchez-Alonso et al., 2018). Já em doenças infecciosas, as VEs estão relacionadas a evasão imunológica (Rodrigues et al., 2008; Ramirez et al., 2017), disseminação de fatores de virulência (Szempruch et al., 2016) e modulação das respostas imunes do hospedeiro (Robbins & Morelli, 2014; Thompson et al., 2016; Yin et al., 2020). No contexto das doenças infecciosas, as VEs têm sido amplamente associadas à persistência do patógeno e à evasão da resposta imune do hospedeiro. Diversos estudos demonstram que essas vesículas podem atuar como mediadoras da comunicação intercelular (Schorey et al., 2015; Coakley et al., 2017). Nos tópicos a seguir, exploraremos com mais profundidade como as vesículas extracelulares participam da interação patógeno-hospedeiro.

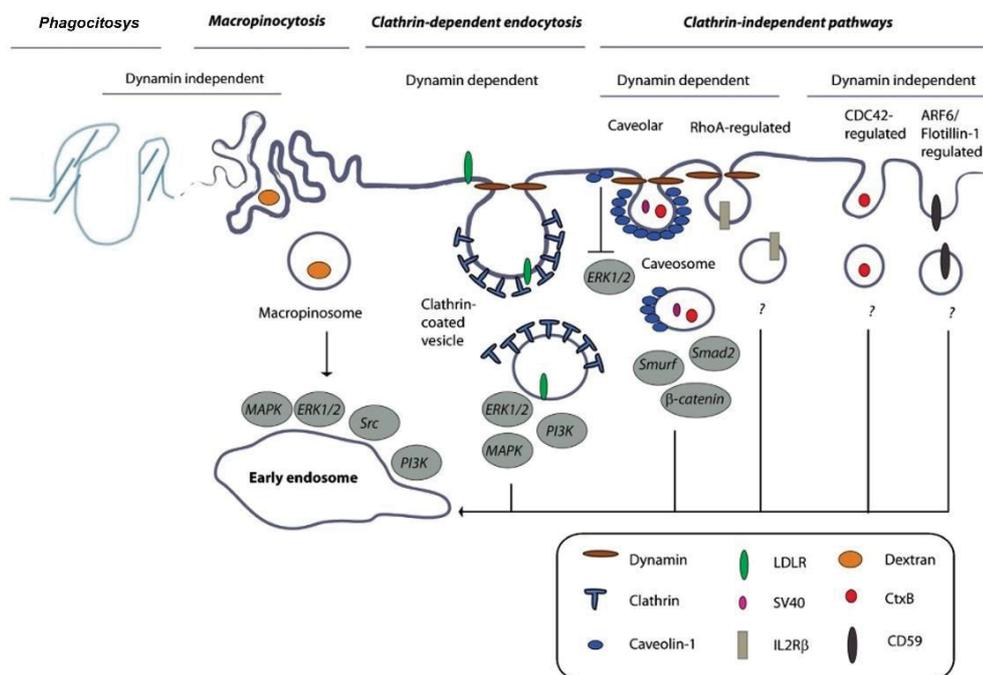
#### “Uptake” de vesículas extracelulares

O “uptake” de VEs refere-se ao processo pelo qual as células capturam e internalizam essas estruturas membranosas liberadas por elas mesmas ou por outras células. Esse fenômeno desempenha um papel essencial na comunicação intercelular. A principal via de internalização descrita de VEs é mediada por endocitose, no entanto, outros mecanismos também podem estar envolvidos, como, macropinocitose, fagocitose, interação mediada por receptores de superfície ou fusão direta das VEs com a membrana plasmática (Mulcahy, Pink & Carter, 2014; Mathieu et al., 2019). O “uptake” de VEs tem sido relatado em diversos modelos e tipos celulares, embora sem a especificação detalhada da via de internalização envolvida, incluindo: células endoteliais incorporam exossomos de *Plasmodium* (Yang et al., 2017), enquanto células intestinais internalizam VEs de *G. intestinalis* (Gavinho et al., 2020). E macrófagos internalizam VEs de *T. gondii*, *Fasciola hepatica* e *Cryptococcus gattii* (Bielska et al., 2018; Li et al., 2018; de la Torre-Escudero et al., 2019)

A endocitose mediada por clatrina (EMC) tem sido considerada o principal mecanismo de internalização celular e envolve a formação de vesículas recobertas por clatrina que se desprendem da membrana plasmática para transportar cargas específicas ao meio intracelular. Esse processo inicia-se com o recrutamento de adaptadores como AP-2, que reconhecem sinais específicos em proteínas transmembranares e promovem o acoplamento da clatrina. A montagem da estrutura reticulada de clatrina gera uma curvatura progressiva na membrana, formando uma vesícula recoberta. A fissão da vesícula ocorre por meio da ação da dinamina, uma

GTPase que se acumula no pescoço da vesícula e catalisa sua separação da membrana. Após a internalização, as vesículas perdem o revestimento de clatrina, permitindo sua fusão com compartimentos endossomais para o tráfego subsequente da carga internalizada (Kaksonen & Roux, 2018) e permitem a reciclagem de receptores. No entanto, evidências crescentes demonstram que diversas vias endocíticas independentes de clatrina (EICs) desempenham papéis essenciais na internalização de material extracelular, variando em seus mecanismos de formação, seleção de carga e destinos intracelulares (Mayor, Parton & Donaldson, 2014). As vias de endocitose independentes de clatrina podem ser classificadas com base na dependência ou não de dinamina. Entre as vias dependentes de dinamina, destaca-se a endocitose mediada por caveolina, que envolve a formação de invaginações ricas nessa proteína na membrana plasmática, conhecidas como caveolas. A dinamina é crucial para a fissão dessas estruturas, permitindo a internalização de moléculas específicas. Outra via dependente de dinamina é a endocitose mediada por endofilina (FEME), caracterizada pela rápida internalização de receptores ativados, como receptores acoplados à proteína G e receptores de tirosina quinase. Nesse mecanismo, a endofilina, uma proteína com domínio BAR, facilita a curvatura da membrana, enquanto a dinamina desempenha um papel essencial na fissão vesicular. Por outro lado, algumas vias independentes de clatrina não dependem de dinamina para sua formação, como a via CLIC/GEEC, que envolve a geração de transportadores independentes de clatrina (CLICs) e sua fusão com compartimentos endossomais iniciais enriquecidos com proteínas ancoradas a GPI (GEECs), sendo um processo regulado por proteínas como GRAF1. Outra via independente de dinamina é a macropinocitose, caracterizada pela formação de protrusões na membrana plasmática que englobam fluido extracelular e partículas, originando grandes vesículas denominadas macropinosomos (Mayor et al., 2014). As principais vias endocíticas envolvidas na internalização das vesículas estão ilustradas na Figura 2.

Figura 2 – Vias de internalização de vesículas extracelulares nas células hospedeiras



O “uptake” de VEs envolve múltiplos mecanismos, sendo eles: endocitose dependente de dinamina: mediada por clatrina, caveolina e RhoA. E as vias independentes de dinamina, incluindo a endocitose mediada flotilina, CD42, macropinocitose e fagocitose. Figura adaptada de Christianson et al., 2014.

A compreensão das vias de internalização de VEs em células hospedeiras tem se tornado um foco importante na pesquisa, especialmente devido ao papel significativo que essas vesículas desempenham na comunicação celular e na patogênese de diversas doenças. Para investigar os mecanismos específicos envolvidos no “uptake” de VEs, muitos estudos utilizam inibidores farmacológicos relacionados à internalização. Entre eles: citocalasina D, demonstrou ser importante para inibição de VEs de *Plasmodium* e *F. hepatica* (Mbagwu et al., 2019; de la Torre-Escudero et al., 2019). Os inibidores clorpromazina e Dynasore bloquearam efetivamente a entrada de VEs de *T. vaginalis* (Rai e Johnson, 2019) e *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 (Bajic et al., 2020) em células hospedeiras. E inibidores de macropinocitose, como o amiloride, reduzem o “uptake” de VEs bacterianos em macrófagos derivados de medula óssea (Pavkova et al., 2021).

Ao bloquear as vias de “uptake” de VEs na interação hospedeiro-patógeno ou inibir o conteúdo dessas vesículas, seria possível desenvolver novas abordagens terapêuticas.

#### Interação patógeno-hospedeiro através das VEs

As interações hospedeiro-patógeno são processos dinâmicos e complexos, nos quais microrganismos, como vírus, bactérias, fungos e parasitas, desenvolveram diversas estratégias para evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência e disseminação (Sem et al., 2016). O desfecho dessa interação depende de uma série de fatores que influenciam a resposta do hospedeiro e a capacidade do patógeno de persistir no organismo. Assim, a infecção pode resultar na eliminação do patógeno (cura), em uma relação de equilíbrio entre ambos, ou no desenvolvimento de patologias que comprometem a homeostase do hospedeiro e, em casos extremos, levam à sua morte (Casadeval & Pirofski, 1999; Sabatke et al., 2024). Um dos mecanismos que vem sendo amplamente reconhecidos nessa interface são as VEs, que atuam como importantes mediadores da comunicação intercelular entre células do hospedeiro e do patógeno (Raposo & Stoorvogel, 2013; Schorey et al., 2015). Essas vesículas podem facilitar tanto a evasão imune quanto a ativação de respostas inflamatórias, dependendo de sua composição molecular e do contexto da infecção (Deatherage & Cookson, 2012; Coakley et al., 2015).

Diversos estudos demonstraram que as VEs podem servir como veículos para transportar fatores de virulência. *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, libera VEs que carregam fatores fundamentais para a sobrevivência do parasita, como trans-sialidases, proteína de superfície associada à mucina, cruzipaina e fosfatases (Bayer-Santos et al., 2013; Ribeiro et al., 2018) que contribuem para a infecção ao facilitar a invasão celular e modular a resposta imune do hospedeiro (Ramirez et al., 2017). Da mesma forma, *Leishmania spp.* secreta VEs ricas em proteínas associadas à sobrevivência parasitária, como GP63, que interfere na ativação de macrófagos e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, promovendo a persistência do parasito no hospedeiro (Hassani & Olivier, 2013). Em *C. neoformans*, foi identificado que suas VEs contêm glucuronoxilomanano (GXM) na capsula polissacarídica que auxiliam na evasão imune (Rodrigues et al., 2008). Em outros modelos fúngicos, como *C. albicans*, VEs isoladas de culturas demonstraram um efeito inibitório na formação de biofilmes por leveduras, além de impedirem a transição morfológica de levedura para hifa (Honorato et al., 2022).

De maneira dependente da linhagem, as VEs de *T. vaginalis* aumentam a citoaderência do parasita às células hospedeiras, ao mesmo tempo em que regulam a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 em células ectocervicais humanas, criando um ambiente favorável à infecção (Twu et al., 2013). O estudo de la Torre-Escudero et al. (2019) analisou as proteínas de superfície das VEs secretadas por *Fasciola hepatica* e demonstrou que principalmente os carboidratos presentes na superfície, desempenham um papel fundamental na interação com receptores específicos das células hospedeiras, facilitando a internalização das VEs pelos macrófagos. De forma semelhante, foi demonstrado que *Echinostoma caproni* e *Fasciola hepatica* secretam VEs contendo proteínas excretoras/secretoras, como enolase, actina e leucina aminopeptidase, que são ativamente internalizadas por células intestinais do hospedeiro (Marcilla et al., 2012).

Em bacterias, Altindis & Mekalanos (2014), demonstraram que as VEs de *Vibrio cholerae* contém proteínas envolvidas na virulência e na estruturação da matriz do biofilme. De forma semelhante, as VEs de *Enterococcus faecium*, apresentam proteínas relacionadas à resistência antimicrobiana, à formação de biofilme e à interação com a matriz extracelular (Wagner et al., 2018).

Nosso grupo demonstrou que *G. intestinalis* libera VEs durante seu ciclo de vida, e que essas VEs desempenham um papel ativo na adesão dos parasitas às células intestinais. São capazes de alterar a maturação de células dendríticas, prejudicando a ativação de linfócitos T e favorecendo um ambiente imunossupressor que permite a infecção persistente (Evans-Osses et al., 2017). Essa modulação da interação com células eucarióticas sugere um possível envolvimento das VEs na patogênese da giardíase, embora os mecanismos subjacentes ainda não estejam completamente esclarecidos. A fim de aprofundar essa compreensão, Gavinho et al. (2020) identificaram duas populações distintas de VEs liberadas por *G. intestinalis*: vesículas extracelulares grandes (LEV) e pequenas (SEV). Esse estudo revelou que as LEVs estavam diretamente associadas ao aumento da adesão do parasita às células intestinais, indicando um papel específico dessa subpopulação na interação patógeno-hospedeiro. Para investigar possíveis estratégias de controle dessa adesão, os autores avaliaram o efeito de inibidores de vesiculação, observando que inibidores de peptidilarginina desiminase (PAD) reduziram seletivamente a liberação de LEVs e, conseqüentemente, diminuíram a adesão do parasita às células hospedeiras *in vitro*. Além disso, a análise proteômica comparativa das LEVs e SEVs revelou diferenças

na composição proteica, incluindo proteínas associadas à virulência e à modulação da resposta do hospedeiro. Esses achados reforçam a hipótese de que as VEs desempenham um papel crucial na regulação da patogênese da giardíase, possivelmente influenciando a colonização e a persistência do parasita no hospedeiro.

Dessa forma, neste estudo, investigamos o papel das LEVs liberadas durante a interação entre *G. intestinalis* e células hospedeiras no processo de internalização celular. Além das VEs derivadas de *Giardia* (gEVs), também analisamos as vesículas liberadas pelas células hospedeiras (hEVs), ampliando nossa compreensão sobre os diferentes perfis de comunicação celular envolvidos na infecção.

Adicionalmente, exploramos o conceito de "vesículas de interação" – intEVs, estruturas híbridas formadas durante o contato direto entre células hospedeiras e patogênicas. Essas vesículas incorporam componentes de membrana de ambos os modelos celulares, representando uma via única de troca molecular que pode impactar significativamente a dinâmica da infecção e a resposta imune do hospedeiro (Deatherage & Cookson, 2012). O estudo dessas vesículas é fundamental para esclarecer novos mecanismos de modulação da infecção e, potencialmente, para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas direcionadas.

## 2.4 CULTURAS DE CÉLULAS 2D E 3D

O modelo tradicional de células Caco-2, derivado de um adenocarcinoma de cólon humano, em monocamada é amplamente utilizado para estudar o epitélio intestinal humano devido à sua semelhança morfológica e bioquímica com as células intestinais do intestino delgado (Zhang, Penny & Jian, 2020; Habanjar et al., 2021). No entanto, esse modelo apresenta limitações significativas, como a falta de heterogeneidade celular e uma estrutura fisiológica simplificada, sem matriz extracelular, polarização ou células subjacentes. Além disso, as junções estreitas intercelulares no modelo Caco-2 podem ser mais restritivas do que no epitélio intestinal humano, o que compromete a absorção de compostos via difusão passiva paracelular (Antunes et al., 2013). Além de diferenças na expressão de enzimas e proteínas de transporte (DiMarco et al., 2017).

Para tentar contornar essas limitações, foram propostos modelos de co-cultura, como a combinação de Caco-2 com células produtoras de muco, células HT-29. Pan et al. (2015), combinaram essas duas linhagens celulares, e os resultados mostraram que a co-cultura de células criou uma barreira intestinal mais realista do

que a monocultura de Caco-2, além disso, também apresentou uma permeabilidade mais precisa para substâncias, como manitol e fluoresceína, simulando melhor a absorção no intestino. Outros estudos que combinam as células Caco-2 e HT-29 destacam esse modelo como uma ótima representação da barreira intestinal (Béduneau et al., 2014; Reale, Huguet & Fessard, 2020).

O estudo das VEs tem se tornado cada vez mais relevante nos últimos anos, devido a ter sido mostrado o seu papel fundamental na comunicação celular e na regulação de processos fisiológicos e patológicos. O uso de modelos tridimensionais (3D) para investigar as VEs oferece uma abordagem mais fiel às condições fisiológicas *in vivo*, superando as limitações dos modelos 2D tradicionais, que não conseguem replicar adequadamente a complexidade do microambiente celular e as interações tridimensionais entre as células (Abdollahi, 2020). Os modelos 3D de cultivo celular incluem esferoides, organoides, scaffolds, hidrogéis, insertos e biorreatores, cada um com características distintas (Habanjar et al., 2021). E apesar de mimetizarem melhor a fisiologia *in vivo*, apresentam limitações como maior complexidade na manutenção, maior variabilidade entre amostras e dificuldade na padronização dos experimentos. Além disso, podem apresentar restrições no acesso a nutrientes e oxigênio em camadas internas, comprometendo a viabilidade celular.

Rocha et al. (2019) demonstraram que as células cultivadas em 3D secretaram, em média, de 1,5 a 4,5 vezes mais VEs por célula do que nas culturas 2D. Além disso, as VEs secretadas pelas células em 3D apresentaram perfis de microRNAs e proteínas distintos dos observados nas células cultivadas em 2D. No estudo das interações hospedeiro-patógeno mediadas por VEs, ainda há poucas pesquisas que investiguem o potencial de culturas 3D, organoides e esferoides. Entre elas estão: o estudo de Costa Verdera et al. (2017) que analisaram os mecanismos de “uptake” de VEs de *Fasciola hepatica* em esferoides 3D, enquanto Eichenberger et al. (2018) demonstraram a internalização de VEs de *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb-EVs) por organoides intestinais de camundongos, reforçando a relevância desses modelos no estudo da interação entre parasitas e o epitélio intestinal.

Os modelos 3D, ao reproduzirem de forma mais fiel a arquitetura e funcionalidade do epitélio intestinal, oferecem um modelo confiável para estudos de permeabilidade, resistência elétrica transepitelial (do inglês, trans-epithelial electrical resistance - TEER) e transporte de substâncias. O TEER é uma medida quantitativa da integridade e coesão das junções entre células epiteliais ou endoteliais, indicando

a capacidade da barreira celular de restringir o fluxo de íons e moléculas através do espaço paracelular. Esse modelo tridimensional permite o desenvolvimento de uma barreira epitelial totalmente diferenciada, essencial para investigar as interações complexas entre células hospedeiras e patógenos, como *G. intestinalis*, sendo fundamental para estudar a dinâmica das VEs e seu impacto na barreira epitelial. Além disso, representam uma alternativa vantajosa aos modelos *in vivo*, pois reduzem a necessidade de experimentação animal, minimizando questões éticas. E permitem um controle mais rigoroso das variáveis experimentais e a replicação de microambientes. O estudo das VEs de *G. intestinalis* é essencial para entender a interação parasita-hospedeiro e a patogênese da giardíase. A investigação de sua internalização pelas células hospedeiras revela as vias endocíticas envolvidas, enquanto análises de lipidômica e proteômica caracterizam seu conteúdo molecular, destacando componentes relacionados à virulência e à modulação imune. O uso de culturas celulares 3D, permite avaliar o impacto das VEs na integridade da barreira epitelial. Essa compreensão pode abrir caminho para novas estratégias de bloqueio do “uptake” de VEs e controle da infecção.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLADOS DE *G. INTESTINALIS* E CULTURA DE CÉLULAS CACO-2

Formas trofozoítas do isolado WB (ATCC 50803) foram cultivadas em meio TYI S-33 (Keister, 1983) suplementado com 10% de soro bovino adulto inativado por calor (SAB) e 1% de penicilina/estreptomicina 1000 U (Gibco TM) a 37°C em condições microaerofílicas. As culturas foram mantidas em tubos de poliestireno em 13 mL com capacidade de 15 mL (BD Biosciences TM) até atingir confluência ( $1 \times 10^6$  células/mL) e subcultivadas a cada 72 h.

As células de adenocarcinoma colorretal humano Caco-2 (ATCC CRL-2102) e células HT-29, foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina 1000 U (Gibco TM). As células foram incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> até formação até atingir confluência de 80%. As células confluentes foram utilizadas para subculturas, a partir da triplicação de 1/5 das células transferidas para garrafas novas a cada 3-4 dias.

#### 3.2 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES)

Para isolamento de vesículas derivadas de *G. intestinalis* (gEVs), vesículas liberadas pelas células hospedeiras, Caco-2 (hEVs) e vesículas originadas da interação entre *G. intestinalis* e células hospedeiras (intEV), os seguintes procedimentos foram realizados: Para VE de *Giardia* (gEV), os parasitas foram desadicionados de culturas confluentes por resfriamento em água /gelo por 15 min e centrifugados a  $600 \times g$  por 5 min. Posteriormente lavados em meio TSY-S-33 sem soro e centrifugados novamente a  $600 g \times 5$  min. Após contagem em hemocítmetro e os parasitos foram normalizados para uma concentração de  $1 \times 10^6$ , em meio TYI-S-33 sem soro, contendo 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Os parasitos nestas condições, foram incubados a 37°C durante 1h, em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, os sobrenadantes foram então submetidos à centrifugações diferenciais, sendo de  $600 \times g$  por 5 min para remover os parasitas, seguida de centrifugação a  $4.000 \times g$  por 30 min para eliminar detritos celulares, e finalmente a  $15.000 \times g$  por 1 hora para isolar as vesículas extracelulares grandes (LEVs). O sobrenadante restante foi então ultracentrifugado por  $100.000 \times g$  durante 4 h, e os pellets contendo SEVs resultantes foram ressuspensos em PBS (1x). Ambas as amostras foram mantidas a 4 °C até o uso posterior, conforme definido anteriormente por Gavinho et al. (2020).

Para VE de células hospedeiras (hEV), células Caco-2 confluentes foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços com uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço e incubadas por 24 h até confluência. Após confluência, as células foram lavadas (1x) com RPMI s/ soro e em seguida, incubadas por 1 hora em RPMI s/ soro contendo 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . O isolamento seguiu o mesmo protocolo de centrifugação diferencial para VEs obtidas dos parasitos. Para VE de interação (intVE), células Caco-2 foram incubadas com parasitas na proporção de 1:10 por 1 hora em meio RPMI s/ soro na presença de 1 mM de cálcio, seguindo o mesmo protocolo de isolamento. Após o isolamento, os pellets contendo as VE foram ressuspensas em 200  $\mu\text{l}$  de PBS 1x e armazenadas a 4 °C.

### 3.3 BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

#### Biogênese de gEVs

Os parasitas foram desaderidos de culturas confluentes por resfriamento em água /gelo por 15 min e centrifugados a  $600 \times g$  por 5 min. Posteriormente lavados em meio TSY-S-33 s/ soro e centrifugados novamente a  $600 g \times 5$  min. Após contagem em hemocítmetro e os parasitos foram normalizados para uma concentração de  $1 \times 10^6$ , em meio TYI-S-33 sem soro, contendo 0, 1, 2, e 4 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Os parasitos nestas condições, foram incubados a 37°C durante 0, 1, 2, 4 e 6 h em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, os sobrenadantes foram então submetidos a centrifugações diferenciais como descrito anteriormente.

#### Biogênese de hEVs

Células Caco-2 confluentes foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço, sendo incubadas por 24 h até atingirem confluência. Após a confluência, as células foram lavadas uma vez com RPMI s/ soro e, em seguida, incubadas com RPMI sem soro contendo 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , juntamente com inibidores (EGTA, citocalasina D) e com tratamento de inativação utilizando PFA 4%. As células foram incubadas por 1 e 2 h a 37°C para a obtenção das VEs.

#### Biogênese de intEVs

Para comparar as VEs liberadas durante a interação, gEVs e hEVs foram isoladas como descrito acima. E para obtenção das intEVs, células Caco-2 foram incubadas com parasitas na proporção de 1:10 por 1 h em meio RPMI s/ soro na

presença de 1 mM de cálcio, e com tratamento de inativação utilizando PFA 4%. As células foram incubadas por 1 hora a 37°C.

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS VES

A concentração de proteínas nas VEs foi determinada utilizando o kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, cat# 23227), seguindo o protocolo do fabricante. Para a lise das VEs, utilizou-se choque térmico. Para a reação colorimétrica, 25 µL da amostra de VEs, diluída na proporção 1:5, foram misturados e incubados com 200 µL do reagente Micro BCA. Uma curva padrão foi feita diluindo a albumina sérica bovina em PBS 1X de 0 a 2000 µg/mL. A placa foi incubada a 37°C por 30 min e a absorbância foi medida a 562 nm utilizando um leitor de microplacas BioTek Synergy H1.

A análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA) foi realizada diluindo cada amostra 1:50 em PBS (1x) e analisando-as utilizando um Nanosight NS300 (Malvern™, Reino Unido), com leituras feitas em triplicata durante vídeos de 60 s a 10 quadros por segundo à temperatura ambiente. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: obturador da câmera –1492, ganho da câmera –512 e limiar de detecção –10.

### 3.5 MARCAÇÃO DE VES

Para os ensaios de “uptake”, as vesículas extracelulares (VEs) foram marcadas com os fluorocromos lipofílicos PKH-26, PKH-27 (Sigma-Aldrich™) ou Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, o corante foi diluído em 1 mL de diluente C, e 25 µL de VEs foram diluídas com 975 µL de diluente C (1:40). Em seguida, as diluições do corante e das VEs foram misturadas na proporção de 1:1. A reação foi incubada por 15 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após esse período, a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de albumina, e as amostras foram lavadas com PBS, seguidas de centrifugação a 15.000 × g por 1 h para descarte do sobrenadante. O pellet de VEs foi ressuspenso em 500 µL de PBS 1X.

### 3.6 ENSAIO DE “UPTAKE” DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Para análise de citometria de fluxo, as células Caco-2 foram semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços. Após 24 h, as células foram lavadas, e incubadas com RPMI s/ soro com 7, 14 e 21  $\mu\text{g}$  de VEs marcadas com Dil no período de 0 a 72h a  $4^\circ\text{C}$  ou  $37^\circ\text{C}$ . Após lavagem com PBS, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2%, tripsinizadas, centrifugadas, e ressuspensas em PBS 1x. As análises do “uptake” foram obtidas através do citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences).

Para microscopia de fluorescência, células Caco-2 confluentes foram tripsinizadas e semeadas em lâminas de 13 mm com uma densidade de  $1-2 \times 10^5$  células. No dia seguinte, as células foram incubadas com VEs marcadas com PKH67 por 1 e 3 h. Posteriormente, as células foram lavadas com meio RPMI sem soro, fixadas em formaldeído a 2% e tratadas com Alexa 647-Phalloidin para visualizar as membranas intracelulares, e DAPI para coloração dos núcleos. As lâminas foram montadas com glicerol a 30% e analisadas em microscópio confocal Nikon A1R HD.

### 3.7 INIBIÇÃO DO “UPTAKE” EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As concentrações dos inibidores utilizados foram baseadas no estudo estabelecido (Sorkin & Go, 2008). As células Caco-2 foram previamente semeadas em uma concentração de  $1 \times 10^5/\text{mL}$  em lamínulas de vidro (13 mm) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. No dia seguinte, o meio foi removido, as células lavadas (1x) com RPMI s/ soro e posteriormente foram pré-incubadas com RPMI s/ soro com os seguintes inibidores: 80-200  $\mu\text{M}$  Dynasore (inibidor de clatrina e caveolina), 10  $\mu\text{M}$  Metil- $\beta$ -ciclodextrina (MBCD, inibidor de raft lipídico/caveolae), 1  $\mu\text{M}$  Wortmannin (inibidor de fagocitose), 2,5  $\mu\text{M}$  Citochalassina D (inibidor de polimerização de actina), 200  $\mu\text{M}$  genisteína (inibidor de caveolina), 200 nM Bafilomicina A (inibidor da vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase), 100  $\mu\text{M}$  Monodansilcadaverina (MDC) (inibidor de clatrina), e 100  $\mu\text{M}$  etil-isopropil Amiloride (EIPA, inibidor do intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ /inibidor de macropinocitose) por 30 min antes da adição de 7  $\mu\text{g}$  VEs, que foram incubadas por 3h. Conforme descrito em outros protocolos, e os inibidores foram mantidos no meio durante todo o experimento.

### 3.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA NA PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE

Para avaliar a viabilidade das células Caco-2 na presença de inibidores de “uptake” (EIPA, Genisteína, MDC e Bafilomicina A), foi realizado um ensaio de resazurina. As células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços, com densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço, e incubadas por 24 h. Após a remoção do meio contendo soro, as células foram expostas ao meio contendo cada inibidor nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de “uptake” de 3 h, seguidas de incubação adicional por 3 h. Poços de controle com meio apenas foram incluídos para subtração de fundo e ajuste de ganho. Posteriormente, foram adicionados 20  $\mu$ L da solução de resazurina (0,15 mg/mL em PBS, pH 7,4) em cada poço, e a placa foi incubada por 2 h a 37°C. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplacas BioTek Synergy H1, com filtros de excitação e emissão ajustados para 560 nm e 590 nm, respectivamente.

### 3.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS CACO-2 NA PRESENÇA DE VES

As células Caco-2 foram semeadas em placas de 24 poços, a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço, e incubadas a 37°C por 3 h. Após esse período inicial, 7  $\mu$ g de vesículas extracelulares (gEV, hEV e intEV), previamente isoladas e quantificadas, foram adicionadas sobre as células aderidas. Em seguida, as células foram incubadas por 48 h. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 h por tripsinização e contagem em hemocitômetro. O controle negativo foi realizado com células que não receberam vesículas, para avaliar o crescimento sem a presença das VEs.

### 3.10 CURVA DE CRESCIMENTO DE *G. INTESTINALIS* NA PRESENÇA DE VES

As culturas de trofozoítos de *G. intestinalis* em fase estacionária foram desaderidas por resfriamento em água/gelo por 15 minuto. Após esse período, foram centrifugados a 600 x g por 5 min e normalizados para uma concentração de  $5 \times 10^4$  trofozoítos. Os trofozoítos foram então transferidos para tubos de 8 mL contendo meio TYI-S-33, suplementado com SAB e antibiótico, na presença ou ausência de 7  $\mu$ g de gEV. As culturas foram incubadas a 37°C por 72 h, o crescimento dos trofozoítos foi acompanhado a cada 24 h, através contagem em hemocitômetro.

### 3.11 RESPOSTA AUTOLOGA DE *G. INTESTINALIS* NA LIBERAÇÃO DE VES AO ESTÍMULO EXÓGENO DE VES

As culturas de trofozoítos de *G. intestinalis* em fase estacionária foram desaderidos por resfriamento em água/gelo por 15 min e centrifugados a  $600 \times g$  por 5 min. Posteriormente lavados em meio TSY-S-33 s/ soro e centrifugados novamente a  $600 g \times 5$  min. Após contagem em hemocitômetro e os parasitos foram normalizados para uma concentração de  $1 \times 10^6$ , em meio TYI-S-33 sem soro, contendo 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Os parasitos nestas condições, foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 5, 30 e 60 min em microtubos de 1,5 mL e receberam o estímulo de diferentes concentrações (2, 5 e 15  $\mu\text{g}$  de gEVs). Nos diferentes tempos os sobrenadantes foram então submetidos a centrifugações diferenciais como descrito anteriormente e quantificados por NTA e dosagem de proteínas.

### 3.12 “UPTAKE” DE VES POR *G. INTESTINALIS*

Vesículas (gEV, hEV e intEV) foram previamente isoladas e marcadas com CFSE. Os parasitos em fase estacionária foram desaderidos por resfriamento em água/gelo por 15 min e centrifugados a  $600 \times g$  por 5 min. Posteriormente, foram lavados em meio TYI-S-33 sem soro e centrifugados novamente a  $600 \times g$  por 5 min. Após a contagem em hemocitômetro, os parasitos foram normalizados para uma concentração de  $1 \times 10^6$  e incubados com 2, 5 e 15  $\mu\text{g}$  de VEs por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS 1 $\times$  e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificação do “uptake” por fluorímetro (excitação: 492 nm; emissão: 517 nm). Outra parte da amostra foi fixada com PFA 2%, montada em lamínulas com Paramount e analisada por microscopia de fluorescência.

### 3.13 INIBIÇÃO DO “UPTAKE” DE VES EM *G. INTESTINALIS*

Para a preparação dos trofozoítos de *G. intestinalis*, as culturas em fase estacionária foram desaderidos em água/gelo por 15 min. As suspensões de trofozoítos foram então centrifugadas a  $1000 \times g$  por 5 min e ressuspensas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  trofozoítos/mL na presença de 2  $\mu\text{g}$  de gEs em condições normais ou inativados por calor, além do inibidor de endocitose - Dynasore (100  $\mu\text{M}$ ). Os parasitos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 1 h. Em seguida, os sobrenadantes foram submetidos a centrifugações diferenciais como descrito anteriormente, e analisados por NTA.

### 3.14 ENSAIO COMPARATIVO DE COMUNICAÇÃO CELULAR PELA TRANSFERÊNCIA DE SECRETOMA TOTAL E LEVS EM *G. INTESTINALIS*

Para estes ensaios definimos como secretoma o sobrenadante liberado durante a incubação do parasita com meio s/ soro e 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  a 37°C por 1 hora. E comparamos a partir de parasitas marcados com CFSE a transferência de marcação para parasitas não marcados na ausência e presença de Dynasore. Comparamos a taxa de marcação com um a transferência controlada de LEVs de *Giardia* previamente purificadas e dosadas, nas mesmas condições de transferência.

As culturas de trofozoítos de *G. intestinalis* em fase estacionária foram desaderidas por resfriamento em água/gelo por 15 min. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 × g por 5 min e ressuspensas em meio TYI-S-33 s/ soro, normalizados a concentração para 1 × 10<sup>6</sup> trofozoítos/mL. Os trofozoítos foram então marcados com CFSE (1:1000) por 15 min à temperatura ambiente, e a reação foi interrompida com a adição de soro adulto bovino (SAB). Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em meio TYI-S-33 contendo 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  e incubadas por 1 hora a 37°C. Simultaneamente, parasitos não marcados foram incubados em meio TYI-S-33 s/ soro com 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , na ausência ou presença de Dynasore (100 μM), por 1 hora a 37°C. Após esse período, os trofozoítos foram centrifugados a 1000 × g por 5 min e ressuspensos em meio TYI-S-33 s/ soro. O sobrenadante dos trofozoítos previamente marcados com CFSE foi transferido para os parasitos não marcados, tratados ou não com Dynasore. Além disso, trofozoítos não marcados foram incubados com 15 e 30 μg de gEVs previamente isoladas e marcadas com CFSE, por 1 hora a 37°C. Após a incubação, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços, e os trofozoítos foram centrifugados a 1000 × g por 5 min, ressuspensos em PBS 1× e transferidos para a mesma placa. A fluorescência foi quantificada em fluorímetro, com excitação em 492 nm e emissão em 517 nm.

### 3.15 ENSAIO DE ADESÃO DE *G. INTESTINALIS* NA PRESENÇA DE VES

O ensaio de adesão foi realizado conforme o protocolo descrito por Evans-Osses et al. (2017). Primeiramente, as células Caco-2 foram semeadas em lâminas de 13 mm a uma concentração de 1 × 10<sup>5</sup> células/poço e incubadas a 37°C por 24 h. Para a preparação dos trofozoítos de *G. intestinalis*, as culturas em fase estacionária foram desaderidos por refrigeração a 4°C por 15 min. As suspensões de trofozoítos

foram então centrifugadas a  $1000 \times g$  por 5 min e ressuspendidas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  trofozoítos/mL na presença de 7 e 14  $\mu g$  de VEs, inibidor de endocitose - Dynasore (100  $\mu M$ ) e apenas os parasitas (controle). A placa foi incubada a  $37^\circ C$ , com 5% de  $CO_2$ , por 3 h. Após a incubação, os trofozoítos não aderidos foram contados em hemocitômetro, e a porcentagem de células aderidas foi calculada.

### 3.16 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

Os lipídios totais das VEs foram extraídos usando método de Bligh e Dyer (1959). As amostras analisadas foram LEVs e SEVs de *G. intestinalis*, na interação com células Caco-2 e LEVs e SEVs controle de células Caco-2 foram colocadas em tubos cônicos de vidro, e adicionados 2 mL de uma mistura de metanol, clorofórmio e água (2:1:0,8). Após agitação em vórtex de 5 em 5 min por 1 h, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 20 min a  $4^\circ C$ , em uma centrífuga refrigerada High-Speed Refrigerated Centrifuge Hitachi (Hitachi Ltd, TO, Japão), usando o rotor R3S/40. Após a centrifugação o sobrenadante da extração foi colocado num tubo novo e reservado. O tubo anterior contendo pellet de amostras foi submetido ao processo de extração novamente. O segundo sobrenadante foi somado ao anterior e então 1 mL de água e 1 mL de clorofórmio foram adicionados. O material foi agitado por 10 s com auxílio do agitador e centrifugado por 30 min nas condições já descritas. Assim foi feita a separação da fase orgânica que contém os lipídios e a fase aquosa da solução, formando 2 fases. A fase inferior (orgânica) foi então retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, e seca por arraste de nitrogênio gasoso, em um banho seco ajustado a  $37^\circ C$ .

### 3.17 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA DE ALTO DESEMPENHO (HPTLC)

As VEs obtidas em ensaios de composição lipídica (sem precursores lipídicos) tiveram os lipídios extraídos e estes ressuspendidos em 50  $\mu L$  de clorofórmio, e analisados por cromatografia em camada fina de alto desempenho (HPTLC, do inglês, High-Performance Thin Layer Chromatography) em placa de sílica (Merck KGaA., Frankfurt, DS, Alemanha), com suporte de alumínio, 20 x 10 cm. Para caracterização de lipídios neutros foi utilizado o sistema de solventes composto por hexano (30 mL), éter dietílico (20 mL), ácido acético (0,5 mL) (Vogel et al., 1962). Os lipídios foram identificados através de comparação com padrões comerciais (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, EUA), como: 1-oleoil rac-glicerol (monoacilglicerol - MAG); 1,2-dioleoyl-

sn-glycerol (diacilglicerol 1,2 - DAG 1,2); 1,3 dioleína (diacilglicerol 1,3 - DAG 1,3); glicerol-trioleato (triacilglicerol - TAG); 3 $\beta$ -colest-5-en-3-ol (colesterol - CHO); colesteril-palmitato (colesterol esterificado - CHOE); 24-hydroxycolesterol (oxiesterol - OXI); e ácido oléico (ácido graxo livre - FA). Foi usado cerca de 3  $\mu$ L de cada um desses padrões em cada placa de sílica, que estavam previamente em concentração 5  $\mu$ g/ $\mu$ L. A HPTLC foi previamente corrida com metanol puro, seca e depois foram depositadas as amostras para caracterização de fosfolipídios. Foi utilizado um sistema de solventes composto por clorofórmio (20 mL), acetona (7,5 mL), metanol (6,5 mL), ácido acético (6 mL), e água destilada (4 mL) (Horwitz & Perlman, 1987). Os padrões de fosfolipídios utilizados foram: L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC); L- $\alpha$  fosfatidiletanolamina (PE); L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC); L- $\alpha$ -fosfatidilinositol (PI); 3-Sn ácido fosfatídico (PA); 3-Sn-fosfatidil-L-serina (PS); L- $\alpha$ -fosfatidil-DL-glicerol (PG) e esfingomielina (SM), mantidos em concentração 5  $\mu$ g/ $\mu$ L. Para as análises de fosfolipídios e lipídios neutros além da corrida com os respectivos conjuntos de solventes, após secas, as placas de sílica foram borrifadas com Reagente de Charring (sulfato de cobre 10%, em ácido fosfórico 4%) (Ruiz & Ochoa, 1997). As HPTLCs foram secas, colocadas entre em placas de vidro com 1 mm de espessura e os lipídios revelados por aquecimento em estufa a 160°C, por aproximadamente 20 min. As placas de HPTLC foram digitalizadas e a densitometria de pixels associada a cada banda de lipídios foi analisada no programa Image Master Total Lab versão 1.11 (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare Life Sciences Corp., Buckinghamshire, GBR) e o volume de pixels ou unidades arbitrárias (U.A.) foram usados para compor os gráficos.

### 3.18 ENSAIO DE *PULSE CHASE* DE UTILIZAÇÃO DE LIPÍDIOS NAS LEVS DE TROFOZOÍTOS DE *G. INTESTINALIS* E CÉLULAS CACO-2, USANDO PRECURSORES LIPÍDICOS (PALMITATO-<sup>3</sup>H INCORPORADO À BSA (<sup>3</sup>H-FA-BSA))

A quantidade do <sup>3</sup>H-FA-BSA suficiente para uma amostra foi obtida da seguinte forma: 1  $\mu$ Ci de palmitato-<sup>3</sup>H (<sup>3</sup>H-FA, ácido graxo (palmitato), [9,10-<sup>3</sup>H(N)]-16:0 PerkinElmer, Boston, MA, USA), foi homogeneizado em 10  $\mu$ L de albumina livre de ácidos graxos 0,1 g % (BSA-FFA, Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, EUA) em PBS pH 7,4 e 500  $\mu$ L de meio de cultura. Após leve mistura por 2 min, em temperatura ambiente, o complexo <sup>3</sup>H-FA-BSA foi esterilizado por filtração com membrana de 0,22  $\mu$ m (Millex-GV, Millipore S.A., Molsheim, França) em ambiente estéril para incubação *in vitro*. Em seguida, 500  $\mu$ L de H-FA-BSA foi adicionado a células Caco-2

previamente semeadas ( $1 \times 10^6$  células/mL) ou a *G. intestinalis* em suspensão ( $1 \times 10^7$  trofozoítos/mL), ambos mantidos em meio RPMI sem soro, e incubados por 6 h a 37°C. Após a incubação, o H-FA-BSA foi removido das células Caco-2, que foram lavadas duas vezes com RPMI s/ soro, enquanto os trofozoítos foram centrifugados e lavados duas vezes com o mesmo meio. Em seguida, as células Caco-2 e os trofozoítos foram incubados novamente em meio RPMI s/ soro por 1 e 24 h. Após esses períodos, as vesículas extracelulares liberadas foram isoladas, permitindo a obtenção de LEVs e SEVs.

### 3.19 CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA (TLC)

Amostras obtidas em ensaios após incorporação de palmitato- $^3\text{H}$  (acima) tiveram os lipídios extraídos (item 6.16) e ressuspensos em 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Uma alíquota de 10% (5  $\mu\text{L}$ ) desse volume foi prontamente levada para quantificação e estimativa da radiação associada ao total da extração, os 90% (45  $\mu\text{L}$ ) restantes foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC, do inglês, Thin Layer Chromatography) em placa de sílica (Merck KGaA., Frankfurt, DS, Alemanha), com suporte de alumínio, 20 x 20 cm. Para caracterização de lipídios neutros foi utilizado o mesmo sistema de solventes para HPTLC, mas com o dobro do volume (101 mL). Após a corrida, as placas já secas, foram coradas com vapores de iodo e os spots selecionados marcados a lápis. O iodo foi evaporado da TLC numa capela de exaustão e os spots previamente marcados foram raspados, a sílica coletada, alocada em vials e a radioatividade associada a cada mancha foi determinada por cintilação líquida

### 3.20 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA PROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSA

As preparações de VEs separadamente (gEV, hEv e intEV) foram ressuspensas em 8M de ureia contendo um inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Um total de  $\pm 100 \mu\text{g}$  de proteínas foram reduzidas com 10 mM de ditioneitol (DTT) a 30°C por 45 min, seguido por alquilação de resíduos de cisteína com 40 mM de iodoacetamida (IAA) por 30 min em temperatura ambiente no escuro. Depois disso, as amostras foram incubadas com DTT 5 mM por 15 min a 30°C. As amostras foram digeridas com tripsina (Promega, Cat#: V5111) (1:50, Enzima: Substrato) por 18 h a 30 °C. Após a digestão, todas as reações foram acidificadas com 10% (v/v) de ácido

trifluoroacético (concentração final de 1% v/v) para interromper a proteólise. As amostras foram centrifugadas por 10 min a  $12.000 \times g$  para remover materiais insolúveis. Os peptídeos tripticos foram dessalinizados antes da análise por LC-MS usando dois discos C18 (disco de extração 3 M Empore TM C18) stage-tips.

### 3.21 ANÁLISE DE DADOS

Para identificação e quantificação de proteínas, dados brutos das execuções LC-MS/MS foram analisados na plataforma MaxQuant, versão 2.6.7.0, usando bancos de dados de *G. intestinalis* e *Homo sapiens* baixados em 01 de março de 2025, do GiardiaDB e UniprotDB. Os parâmetros de busca foram tolerância de MS de 20 ppm (Orbitrap), tolerância de MS/MS de 0,5 Da (Iontrap), comprimento mínimo de 2 peptídeo de sete aminoácidos e tripsina com clivagem específica, permitindo duas clivagens perdidas. A carbamidometilação de cisteínas foi definida como uma modificação fixa e a oxidação de metionina e a acetilação N-terminal de proteína como modificações variáveis. Foi usado o algoritmo de correspondência entre execuções. Uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 1% foi aplicada aos níveis de PSM e proteína. Após a remoção de contaminantes potenciais, reversos e acertos 'somente identificados pelo local', proteínas identificadas nas duas réplicas de cada condição foram consideradas em análises posteriores. O agrupamento hierárquico foi realizado usando a distância euclidiana no software Perseus v. 2.1.3.0, a intensidade (valores XIC) das proteínas foi transformada em  $\log_2$  e os valores ausentes foram substituídos pelos valores de distribuição normal do conjunto de dados (largura: 0,3; deslocamento para baixo: 1,8). A análise funcional de proteínas encontradas em VEs foi realizada por análise de enriquecimento de ontologia genética (GO)(<https://geneontology.org/>). Os diagramas de Venn foram criados usando a ferramenta BioVenn (Hulsen et al., 2008).

### 3.22 CULTURA CELULAR EM MODELO 3D

As células foram semeadas em insertos de Transwell com poros de  $0,4 \mu\text{m}$  e área de crescimento de  $0,3 \text{ cm}^2$ , na densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/inserto. As células Caco-2 ou HT-29 foram cultivadas individualmente em cada inserto, enquanto nos experimentos de co-cultura, as células foram semeadas na proporção de 9:1 (Caco-2:HT-29) e mantidas em cultivo por 10 ou 21 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h até a diferenciação celular completa. Nos experimentos de privação de meio,

após 48 h de diferenciação, o meio foi mantido exclusivamente no compartimento basolateral, enquanto o compartimento apical foi privado de meio.

### 3.23 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSEPITELIAL – TEER

Para determinar a integridade das células diferenciadas (Caco-2 e ou HT-29), a resistência elétrica transepitelial (TEER) foi medida usando um volt-ohmímetro epitelial (EVOM2 voltmeter). As medições foram realizadas em cada troca de meio de cultura de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento de medição inclui medir a resistência em branco da membrana semipermeável apenas (sem as células) e medir a resistência através da camada celular na membrana semipermeável. A resistência específica das células em unidades de  $\Omega$  pode ser obtida da seguinte forma:

$$TEER_{REPORTED} = R_{TISSUE}(\Omega) \times M_{AREA}(cm^2)$$

Para avaliar a integridade da barreira utilizando o TEER, as células diferenciadas aos 10 ou 21 dias de diferenciação, foram incubadas com *G. intestinalis* (MOI 10), gEVs (80–200  $\mu$ g) e a combinação de gEVs e *G. intestinalis* utilizando meio RPMI suplementado com 2% de SFB, por 48 h a 37°C. Após 24 h de incubação, o controle positivo (EGTA, EDTA, metoprolol, DMSO) foi adicionado às células e o tempo de incubação foi mantido. O TEER foi medido antes e após a infecção para monitorar a alteração na integridade da barreira.

### 3.24 PERMEABILIDADE PARACELULAR

Após as 48 h de incubação, o meio contendo soro foi removido e substituído por meio sem soro, seguido de incubação por 30 min. Em seguida, o meio foi descartado e 800  $\mu$ L de meio s/ soro foi adicionado ao compartimento basal. No compartimento apical, foi adicionado FITC-dextran na concentração final de 1 mg/mL, com posterior incubação por 6 h a 37°C. Após esse período, o meio dos compartimentos basal foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços. A fluorescência foi medida com base em uma curva padrão de FITC-dextran, utilizando os seguintes parâmetros: excitação em 483 nm e emissão em 525 nm.

### 3.25 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Células Caco-2 foram semeadas em uma densidade de  $1 \times 10^4$ /mL em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C. No dia seguinte, as células foram incubadas com 7 a 200 ug de VEs durante 1, 3 e 24 h. Em seguida, foi adicionado o Reagente CellROX® (Invitrogen - #C10422) na concentração final de 5  $\mu$ M às células e incubado por 30 min a 37°C. Após esse período, o meio foi removido e as células lavadas três vezes com PBS. A fluorescência foi medida a 640/665 nm utilizando um leitor de microplacas BioTek Synergy H1.

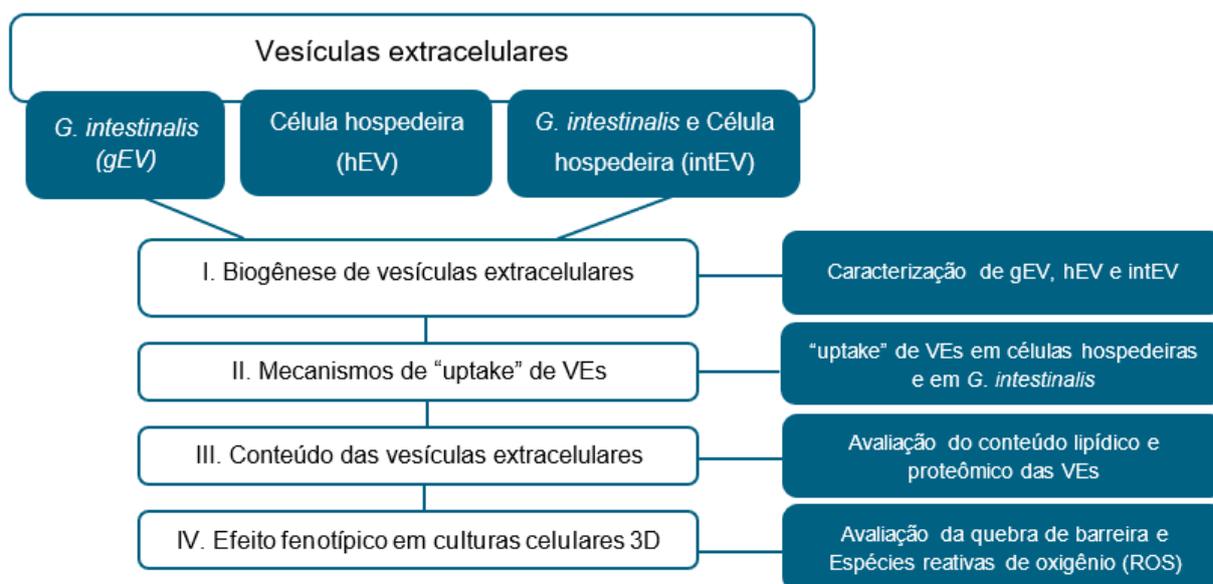
### 3.26 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram analisados no GraphPad Prism 6.0 em triplicata. Resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (SEM). Significância estatística foi determinada por teste T não pareado ou ANOVA com post hoc Tukey ou Dunnett, considerando  $p < 0,05$  significativo.

## 4 RESULTADOS

Os resultados desta tese serão divididos em 4 seções seguindo o fluxo experimental apresentados na figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do desenho experimental desenvolvido durante a tese

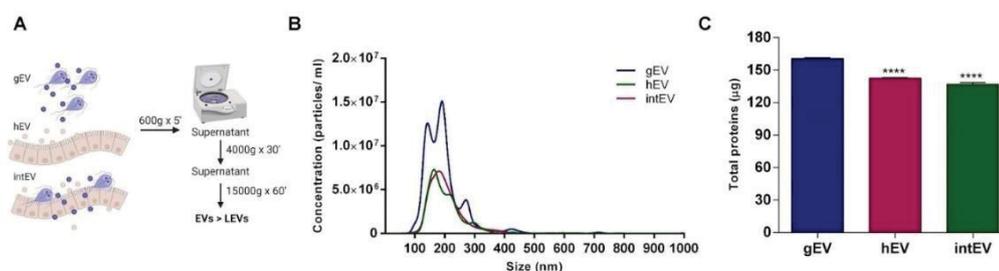


### 4.1 BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS DURANTE A INTERAÇÃO PATOGENO HOSPEDEIRO

Durante a interação entre *G. intestinalis* e células hospedeiras (Caco-2), a biogênese das VEs pode ocorrer por diferentes mecanismos, resultando em populações heterogêneas com potenciais diferentes funções, podendo influenciar no seu papel na comunicação parasita-hospedeiro. Assim, para compreender melhor essas diferenças, trabalhamos com 3 tipos de VEs: vesículas originadas do parasito *G. intestinalis* (gEV), vesículas liberadas pelas células Caco-2 ou células hospedeiras (hEV) e vesículas de interação entre *G. intestinalis* e células Caco-2 (intEV), que podem conter componentes de membrana do parasita ou das células hospedeiras (Figura 4A) e que também são chamadas de vesículas híbridas. Inicialmente, caracterizamos as populações de vesículas gEV, hEV e intEV por análise de NTA e dosagem de proteínas. A análise por NTA demonstrou que as gEVs são as mais produzidas/liberadas entre os diferentes tipos de VEs, apresentando tamanhos semelhantes, entre 150-300 nm, com um pico em 200 nm (Figura 4B). Curiosamente,

a dosagem de proteínas não revelou diferenças notáveis entre as VEs, apesar do número de vesículas de *G. intestinalis* ser maior, indicando uma possível diferença no conteúdo ou carga das vesículas (Figura 4C).

Figura 4 – Caracterização das vesículas extracelulares isoladas de diferentes modelos



A) Esquema ilustrativo do protocolo de isolamento das vesículas extracelulares derivadas de *G. intestinalis* (gEV), células hospedeiras (hEV) e da interação entre *G. intestinalis* e células hospedeiras (intEV). (B) Distribuição do tamanho das vesículas analisadas por nanoparticle tracking analysis (NTA). (C) Quantificação da concentração total de proteínas associadas às vesículas. (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

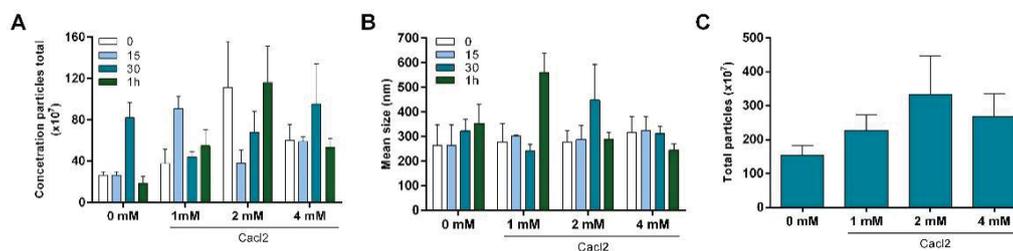
### Biogênese de VEs de *G. intestinalis* (gEV)

A fim de compreender melhor os mecanismos de liberação de VEs, é importante considerar fatores que possam influenciar esse processo. Um desses fatores é o estímulo de cálcio, um regulador conhecido da secreção de vesículas, principalmente as microvesículas, ou LEVs. Para testar essa hipótese, incubamos os parasitas com diferentes concentrações de cálcio (0, 1, 2 e 4 mM) por 1 h. Após esse período, os parasitas foram centrifugados, e as VEs obtidas das centrifugações diferenciais foram analisadas por NTA. Essa técnica permite identificar diferentes subpopulações de VEs, como LEVs e SEVs, bem como determinar sua concentração.

Na Figura 5A, a comparação entre as concentrações de partículas revelou uma distribuição heterogênea, tanto em relação à concentração de cálcio quanto ao tempo de incubação nos diferentes grupos. A Figura 5B apresenta o tamanho médio das VEs, que varia entre 250 e 400 nm, predominantemente LEVs, com exceção de picos maiores em 1 e 2 mM, que alcançam até 600 nm. Já a Figura 5C representa a somatória das partículas ao longo do tempo (0 a 1 h), demonstrando que o estímulo de cálcio influencia a liberação de VEs, uma vez que observamos um efeito dose-dependente até 2 mM. Em 4 mM, há uma redução na quantidade de partículas, possivelmente devido à instabilidade celular. Considerando que a concentração

intracelular fisiológica de cálcio é de aproximadamente 1 - 1,5 mM, optamos por utilizar 1 mM como condição nos experimentos subsequentes.

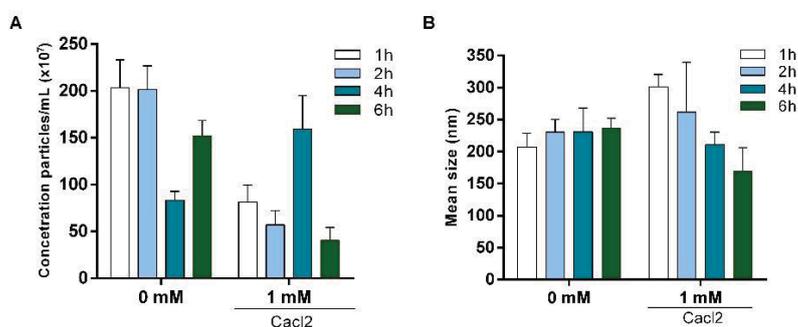
Figura 5 - Estímulo de cálcio na biogênese de vesículas extracelulares de *G. intestinalis*



A) Concentração de partículas na ausência e presença de 1, 2 e 4 mM de cálcio durante 1h de incubação, analisados por NTA. B) Tamanho médio das partículas na ausência e presença de 1, 2 e 4 mM de cálcio durante 1h de incubação. C) Somatória da concentração de partículas de 0 a 4 mM de cálcio em 1 h.

Em seguida, investigamos se a liberação de VEs pelo parasita ocorre de forma contínua. Para isso, acompanhamos a liberação de VEs entre 1 e 6 h, na ausência e na presença de 1 mM de cálcio. Na ausência de cálcio, observamos um aumento na liberação de VEs até 2 h, seguido de uma redução posterior. Já na presença de cálcio, o perfil de liberação foi mais heterogêneo, apresentando um pico em 4 h (Figura 6A). Curiosamente, o tamanho das VEs não sofreu alterações na ausência de cálcio, mas na presença de cálcio houve uma redução no tamanho médio das VEs, sugerindo mudanças nas subpopulações (Figura 6B).

Figura 6 – Dinâmica da liberação de vesículas extracelulares por *G. intestinalis*



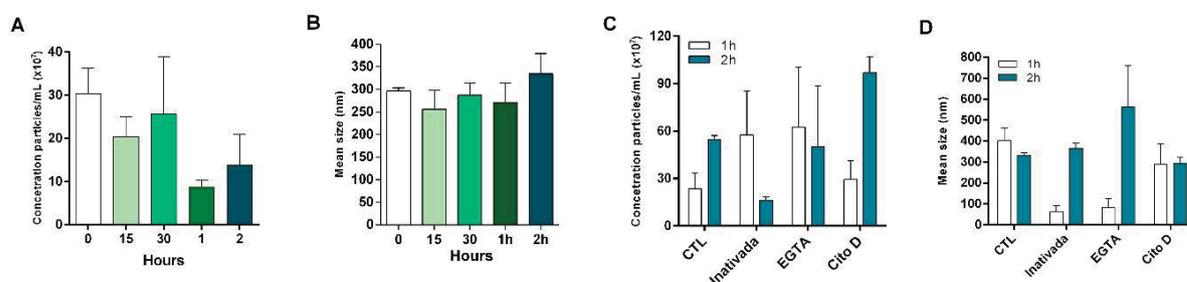
A) Concentração de partículas na ausência e na presença de cálcio de 1 a 6 h, analisados por NTA. B) Tamanho médio das partículas na ausência e presença de cálcio de 1 a 6 h.

## Biogênese de VEs em células hospedeiras (hEV)

Após avaliarmos a biogênese das VEs do parasita, passamos a investigar o processo de liberação de VEs pelas células hospedeiras, buscando compreender possíveis diferenças entre os modelos. Iniciamos os experimentos investigando como as células hospedeiras respondem ao estímulo de cálcio em diferentes tempos.

Avaliamos a liberação de VEs na presença de 1 mM cálcio de 0 a 2 h. Demostramos que as células parecem ter um estímulo de liberação de VEs nos primeiros 30 min e uma redução após 1 h, o que poderia indicar que estas vesículas são liberadas e captadas pela célula através do tempo (Figura 7A). Entretanto, não houve alterações nos tamanhos das VEs, como pode ser visto na Figura 7B. Para entender melhor o papel das células hospedeiras na liberação de VEs, nós incubamos células hospedeira (Caco-2) com diferentes inibidores: EGTA (inibidor de cálcio), citocalasina D (inibidor de polimerização de actina) e também inativamos células com PFA 4%, durante 1 e 2 h. Os inibidores não reduziram a liberação de VEs, e apenas observamos inibição na liberação de vesículas em células inativadas em 2 h (Figura 7C). Interessantemente, quando observamos o tamanho destas VEs, as células que foram inativadas ou incubadas com EGTA parecem induzir um efeito inibitório das VEs maiores (LEVs), que são derivadas de membrana plasmática e dependente de cálcio, durante uma hora de incubação, mas não em 2 h, possivelmente por tem um predomínio de LEVs e não conseguir inibir as SEVs (vesículas menores) (Figura 7D). Entretanto, os mecanismos pelo qual isso acontece ainda são desconhecidos e podem representar uma somatória de eventos de biogênese e “uptake” acontecendo simultaneamente.

Figura 7 – Biogênese de vesículas extracelulares de células hospedeiras

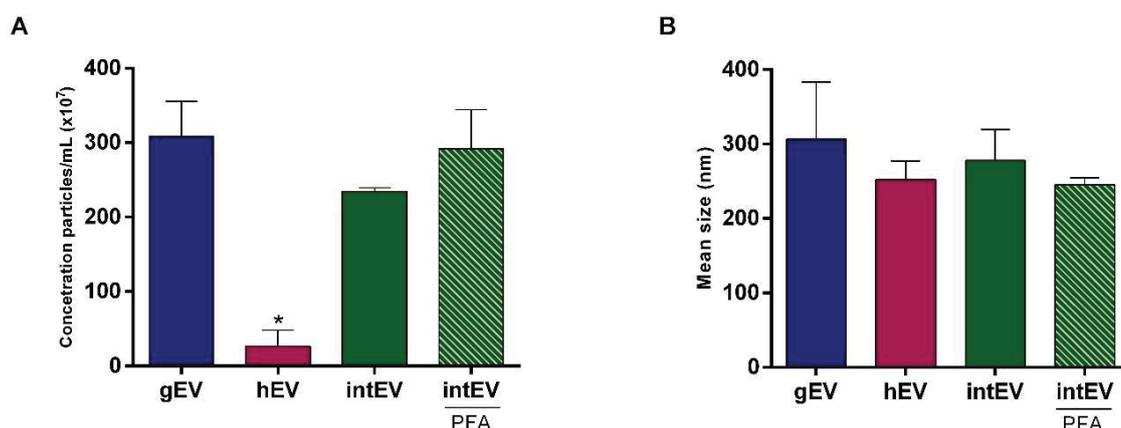


A) Concentração de partículas na presença de 1 mM de cálcio durante 2 h, analisadas por NTA. B) Tamanho médio das partículas liberadas durante 2 h. C) Concentração de partículas liberadas por células Caco-2 após tratamento com inibidores: EGTA (quelante de cálcio), citocalasina D (inibidor de polimerização) e PFA 4% para inativação de células, analisadas por NTA. D) Tamanho médio das partículas após tratamentos com inibidores e inativação das células Caco-2.

### Biogênese de VEs durante a interação parasita célula-hospedeira

Para entender se interação entre parasita e célula hospedeira seria capaz de estimular uma maior liberação de VEs, foram isoladas VEs do parasita (gEV), de células hospedeira (hEV) e da interação entre parasita/*G. intestinalis* e células hospedeira (intEV), em condições normais e em condições de inativação com paraformaldeído 4% (PFA) durante 1 h a 37°C, utilizando o estímulo de 1 mM de cálcio. Nós observamos que o parasita produz/libera mais VEs que os grupos de VEs (hEV e intEV), em condições normais, sem limitar a sua produção na presença de células inativadas (Figura 8A). Indicando na interação de parasita e célula hospedeira, o parasita ainda induz um aumento na liberação de vesículas. Além disso, nós demonstramos que as VEs das diferentes origens não apresentaram grandes diferenças no tamanho (Figura 8B).

Figura 8 – Caracterização de vesículas de interação entre parasita e hospedeiro (intEV)



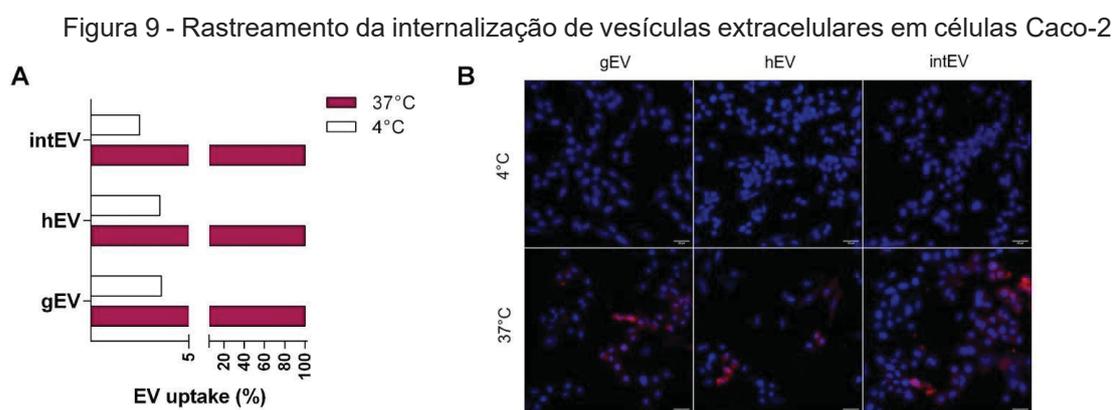
A) Concentração de partículas obtidas de parasitas (gEV), células hospedeira (hEV) e interação entre parasitas e células hospedeiras em condições normais (intEV) e inativadas com PFA 4% (intEV PFA), analisadas por NTA. B) Tamanho médio das partículas liberadas entre as diferentes condições.

## 4.2 DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS DE “UPTAKE” EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

### Análise do “uptake” de vesículas extracelulares em células Caco-2

A compreensão de como as VEs são internalizadas pelas células hospedeiras (Caco-2) é crucial para desvendar os mecanismos de comunicação entre parasitas e células hospedeiras. Esse processo de “uptake” (internalização) pode influenciar a modulação da função celular e abrir caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de controle parasitário.

Para investigar a internalização de VEs por células intestinais humanas, Caco-2, isolamos e marcamos três populações de VEs (gEVs, hEVs e intEVs) previamente, com o corante fluorescente PKH26. As células Caco-2 foram incubadas com essas VEs sob duas condições de temperatura: 37°C (condição fisiológica) e 4°C (condição inibitória de processos dependentes de energia). Os resultados mostraram que o “uptake” das VEs ocorreu de maneira eficiente a 37°C, enquanto a 4°C há uma mínima internalização das VEs, conforme evidenciado tanto pela quantificação do percentual de “uptake” (Figura 9A) quanto pela microscopia de fluorescência (Figura 9B). A baixa incorporação das VEs a 4°C sugere que o processo de internalização é mediado por mecanismos endocíticos ativos e dependentes de energia, uma vez que a redução da temperatura impacta a dinâmica das vias endocíticas.



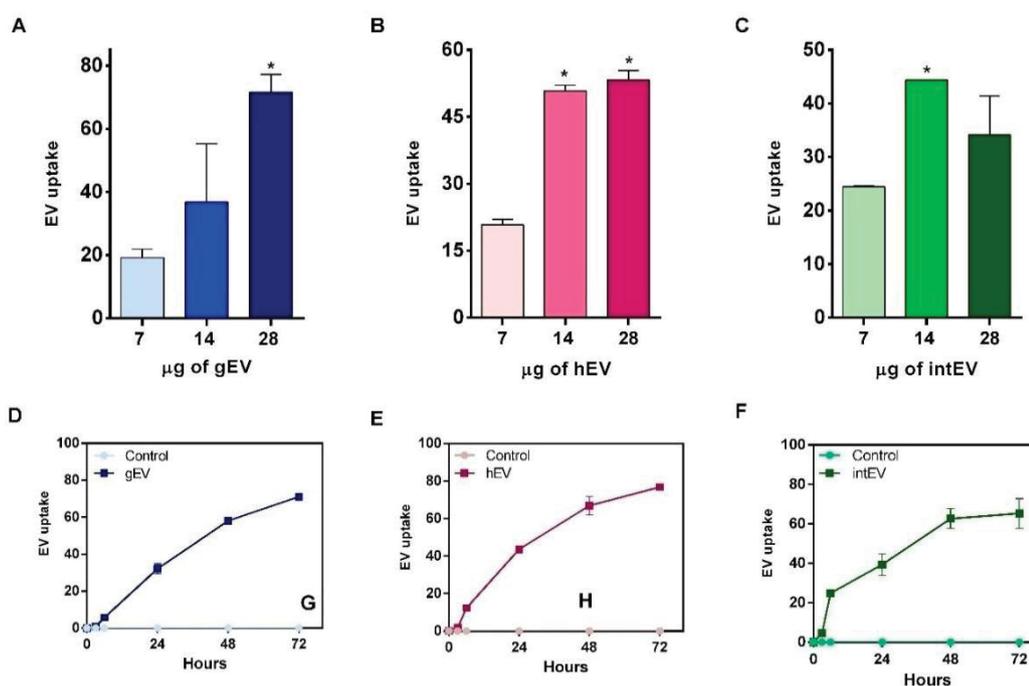
A) Análise de citometria fluxo do “uptake” de VEs a 37 °C e 4 °C. B) Imagens de microscopia confocal de células Caco-2 incubadas com VEs marcados com PKH26 (vermelho) a 4 °C e 37 °C, os núcleos foram corados com DAPI (azul).

Além disso, nossos experimentos revelaram que o “uptake” de VEs pelas células Caco-2 apresentaram uma tendência dose (Figuras 10A–C) e cinética dependente (Figuras 10D–F). Observamos que o aumento na concentração das VEs levou a uma maior internalização, com diferenças estatisticamente significativas nas condições de 14 e 28 µg, sugerindo um processo dose-dependente para a internalização dessas vesículas, o que pode implicar mecanismos moleculares ou ligante receptor envolvidos na internalização de VEs.

Em relação à cinética de internalização, as VEs apresentaram um padrão de “uptake” progressivo ao longo do tempo, com um aumento contínuo na sua incorporação pelas células Caco-2 entre 24 e 72 h. Notavelmente, as intEVs foram internalizadas mais rapidamente nas primeiras h (6 h) de incubação em comparação

com gEVs e hEVs. No entanto, esse efeito inicial foi atenuado com o passar do tempo, levando a uma captação semelhante entre os diferentes tipos de VEs após 72 h. Esses achados sugerem que mecanismos distintos podem estar envolvidos na fase inicial da internalização, influenciando a dinâmica do “uptake” celular.

Figura 10 - Internalização de vesículas extracelulares por células Caco-2 são dependentes da concentração e tempo



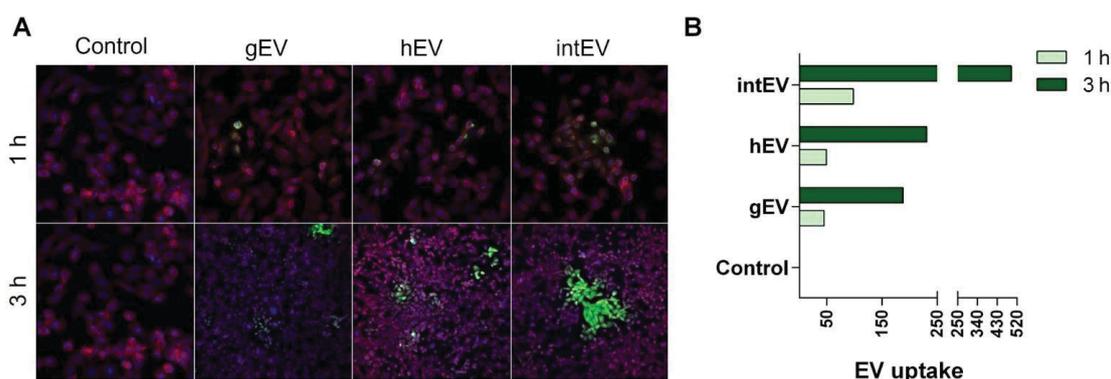
A-C) “uptake” de VE dependente da dose em células Caco-2 após 6 h para gEVs (A), hEVs (B) e intEVs (C). D-F) Cinética dependente do tempo da internalização de VEs em células Caco-2 para gEVs (D), hEVs (E) e intEVs (F) ao longo de um período de 72 h.

“uptake” diferencial das vesículas de interação (intEVs)

Para verificar se as intEVs apresentam cinéticas de internalização mais rápidas e visualizar sua localização intracelular em células Caco-2 em comparação com hEV e gEV nas h iniciais, realizamos análise por microscopia de fluorescência comparando os três tipos de VEs em 1 e 3 h. Inicialmente, na primeira hora, o “uptake” foi uniforme entre todos os tipos de VEs. No entanto, após 3 h, foi observado um aumento expressivo de intEV internalizadas pelas células Caco-2, contrastando com a internalização de hEV e gEV (Figura 11A-B). Esse resultado sugere que as intEVs possuem uma maior afinidade as células intestinais ou um mecanismo de internalização mais eficiente nas fases iniciais do processo. Interessantemente, essa

observação apoia os achados obtidos por análise de citometria de fluxo, reforçando a hipótese de que diferentes subtipos de VEs interagem de maneira distinta com as células intestinais, o que pode refletir diferenças em sua composição molecular ou nos receptores celulares envolvidos na captação.

Figura 11 – Vesículas de interação parasita-célula hospedeira são rapidamente internalizados por células intestinais



A) Imagens de microscopia confocal comparando a internalização de EVs derivados de *G. intestinalis* (gEVs), EVs derivados do hospedeiro (hEVs) e EVs resultantes da interação hospedeiro-parasita (intEVs) em células Caco-2 após 1 e 3 h de incubação. O controle não mostra sinal de EV. EVs internalizados são destacados em verde (PKH67), enquanto os núcleos das células são mostrados em azul (DAPI) e o citoesqueleto em vermelho (Faloidina). B) Quantificação da captação de EV com base na intensidade de fluorescência após 1 e 3 h. Barra de escala = 10 micrômetros.

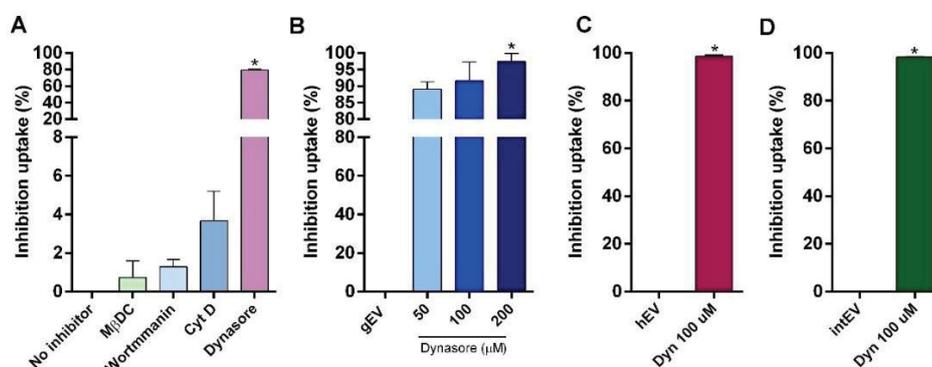
Caracterização dos mecanismos de endocitose no “uptake” de vesículas extracelulares de *G. intestinalis* em células hospedeiras

O “uptake” de VEs pelas células hospedeiras desempenha um papel fundamental na comunicação intercelular e no transporte de mediadores de sinais biológicos, através dos mecanismos de endocitose.

Para investigar as vias endocíticas específicas envolvidas na internalização de gEV, realizamos experimentos utilizando células Caco-2 pré-incubadas com diferentes inibidores das diversas vias de endocitose. Em seguida, as VEs marcadas com PKH26 foram adicionadas para avaliar o “uptake”. Após a incubação, a internalização das VEs foi avaliada por citometria ou microscopia de fluorescência, permitindo a visualização e quantificação das VEs internalizadas sob cada condição experimental. Conforme evidenciado pela análise por citometria de fluxo, Dynasore, um inibidor da endocitose mediada por clatrina e caveolina, apresentou alta eficácia, reduzindo em cerca de 90% o “uptake” de gEV. Em contrapartida, outros inibidores,

como Citocalasina D que impede a polimerização da actina), Wortmannin (que bloqueia a fagocitose) e metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD, que interfere na integridade das balsas lipídicas), não demonstraram efeito inibitório relevante (Figura 12A). A ação do Dynasore sobre a captação de gEVs mostrou-se dose-dependente, sugerindo um papel essencial das vias mediadas por clatrina e caveolina nesse processo (Figura 12B). Além disso, o tratamento com Dynasore inibiu quase completamente a internalização de hEVs e intEVs (Figuras 12C-D), mostrando que são processos de internalização mediados principalmente por dinamina.

Figura 12 – O “uptake” de vesículas extracelulares de *G. intestinalis* é dinamina-dependente

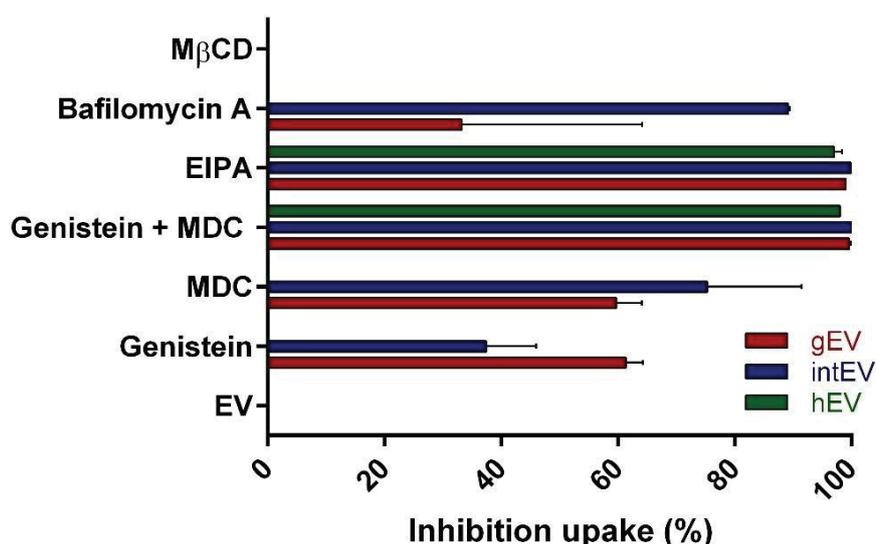


A) Análise de citometria de fluxo mostrando inibição do “uptake” de VEs derivados de *G. intestinalis* (gEV) na presença de diferentes inibidores endocíticos, incluindo metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), wortmannin, citocalasina D, Dynasore e controle (no inibidor, sem inibidor). B) Inibição do “uptake” dependente da dose em gEV por Dynasore em concentrações de 50, 100 e 200  $\mu$ M. (C-D) Inibição do “uptake” de VEs derivado do hospedeiro (hEV) e EV derivado da interação (intEV) por Dynasore a 100  $\mu$ M.

Para ampliar a análise, utilizamos um conjunto adicional de inibidores de endocitose, direcionados tanto a vias dependentes quanto independentes de dinamina. Os mecanismos mediados por dinamina, como a endocitose via clatrina e caveolina, foram avaliados por meio do uso de genisteína e monodansilcadaverina (MDC), permitindo uma investigação mais detalhada do papel dessas estruturas no “uptake” de VEs. Paralelamente, Bafilomicina A1 e EIPA foram empregados para explorar vias independentes de dinamina, incluindo macropinocitose e tráfego endossossomal. Os dados apresentados na Figura 13, indicam que o “uptake” de intEV foi a mais afetada, com inibição significativa observada, sobretudo nos tratamentos com Bafilomicina A, MDC e a combinação Genisteína/MDC. A inibição promovida pela Bafilomicina A alcançou aproximadamente 90%, sugerindo que a internalização dessas vesículas ocorre predominantemente por vias sensíveis a variações de pH. O

EIPA, por sua vez, reduziu a internalização de todos os tipos de VEs de maneira uniforme, indicando o envolvimento do transporte de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> nesse processo. A ação combinada de Genisteína e MDC revelou um efeito sinérgico, afetando especialmente as intEV, o que sugere a participação de múltiplas vias endocíticas. De forma individual, o MDC reduziu a internalização de intEV, enquanto a Genisteína afetou as gEV, reforçando a dependência dessas vesículas das vias mediadas por clatrina e caveolina, em comparação com as hEV. Por outro lado, o tratamento com M $\beta$ CD, que desestabiliza balsas lipídicas e interfere nas vias mediadas por caveola, não reduziu a internalização de nenhuma classe de VEs, corroborando a ausência de envolvimento das caveola no “uptake” de gEVs.

Figura 13 – O “uptake” de vesículas de *G. intestinalis* é dependente de clatrina e macropinocitose em células Caco-2



A inibição percentual do “uptake” de gEVs, hEVs e intEVs foi avaliada em células Caco-2 tratadas com os inibidores de endocitose Bafilomicina A1, EIPA, Genisteína, MDC, M $\beta$ CD e Dynasore após 3 h de incubação. A quantificação da internalização foi realizada por análise de imagens de microscopia confocal. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

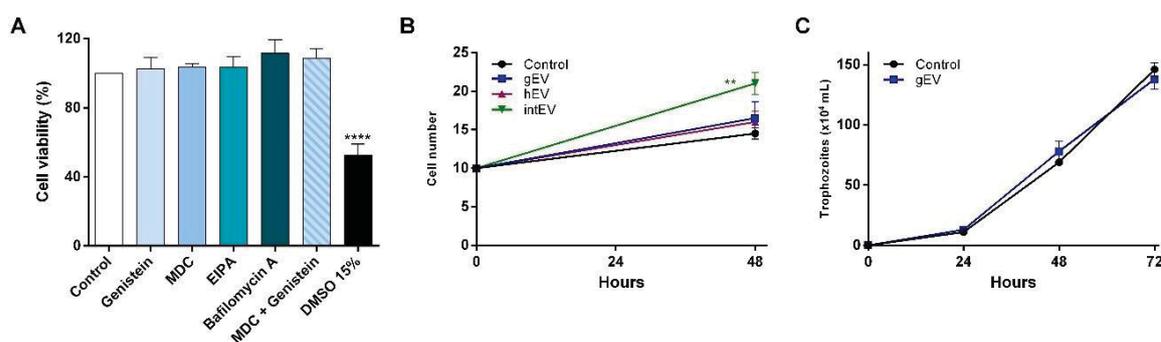
Para excluir a possibilidade de que os efeitos inibitórios observados estivessem associados à toxicidade celular, avaliamos a viabilidade das células Caco-2 na presença desses inibidores (Figura 14A). Os tratamentos com Genisteína, MDC, EIPA, Bafilomicina A e a combinação Genisteína-MDC preservaram a viabilidade celular acima de 80%, indicando baixa citotoxicidade e garantindo a confiabilidade dos experimentos sem a necessidade de normalização para o número de células ou percentual de captação. Em contrapartida, a exposição a 15% de DMSO resultou em uma redução significativa da viabilidade celular, servindo como controle positivo de

citotoxicidade. Esses achados confirmam que a inibição do “uptake” observada decorre da interferência direta nos mecanismos de internalização das vesículas, através das diferentes vias de endocitose, e não de efeitos deletérios sobre a viabilidade celular.

Além disso, realizamos um experimento para investigar o impacto das VEs na proliferação celular. Os resultados mostraram que as intEVs induziram um aumento significativo na proliferação das células Caco-2 após 48 h de incubação, enquanto as hEVs e gEVs não demonstraram efeitos evidentes sobre o crescimento celular (Figura 14B).

Adicionalmente ao efeito das vesículas nas células hospedeiras, investigamos se as gEV influenciariam o crescimento do parasita ao longo de 72 h. No entanto, não foi observada nenhuma alteração significativa na taxa de proliferação do parasita em resposta ao tratamento com gEV (Figura 14C). Esses achados sugerem um papel específico das intEV na modulação do crescimento celular durante a interação parasita célula hospedeira, possivelmente mediado por mecanismos de sinalização celular distintos aos próprios do crescimento parasitário em cultura axênica.

Figura 14 – Avaliação da viabilidade celular e impacto das vesículas extracelulares na proliferação celular e crescimento do parasita



A) Viabilidade das células Caco-2 na presença dos inibidores de endocitose utilizados no estudo. Os tratamentos com Genisteína, MDC, EIPA, Bafilomicina A, combinação Genisteína-MDC e controle positivo de toxicidade (15% de DMSO). (B) Quantificação da proliferação das células Caco-2 após 48 h de incubação com gEV, hEV e intEV. (C) Avaliação do crescimento do parasita incubado com gEV por até 72 h. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

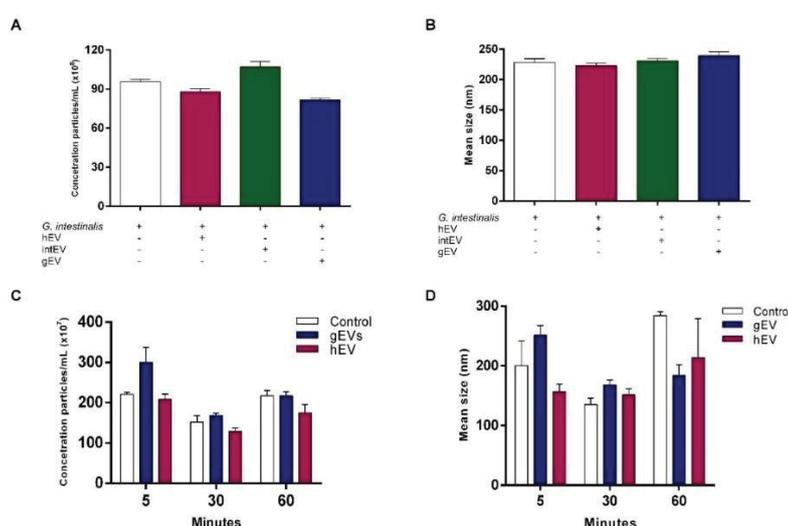
#### 4.3 COMUNICAÇÃO ENTRE PARASITAS MEDIADA POR VESÍCULAS

A comunicação entre parasitas por meio de VEs pode desempenhar um papel crucial na regulação de processos celulares e na adaptação do parasita ao ambiente. Embora diversos estudos tenham evidenciado a capacidade de células hospedeiras

internalizarem VEs provenientes de patógenos, ainda permanece incerto se essas VEs também desempenham um papel como mediadoras na comunicação celular entre os próprios parasitas.

Diante disso, decidimos investigar se *G. intestinalis* responde ao estímulo de VEs, tanto próprias quanto exógenas, e avaliar se esse processo influencia a comunicação parasita-parasita. Inicialmente, investigamos a resposta de *G. intestinalis* em contato com gEV, hEV e intEV no período de uma hora. Nossos resultados demonstraram que a liberação de VEs não aumenta em resposta a estímulos de VEs exógenas dentro deste período, independentemente da origem (Figura 15A). Além disso, notamos que o tamanho das VEs liberadas permaneceu inalterado sob essas condições (Figura 15B). Para entender se o efeito do estímulo das VEs ocorreria em um tempo mais curto, realizamos um acompanhamento da liberação de VEs após 5, 30 e 60 min após a exposição a gEV e hEV. Os resultados revelaram que no início, as gEVs estimularam a liberação de VEs mais eficazmente em comparação com as hEVs, mas após 30 min, o efeito se dissipou, retornando aos níveis de controle sem adição de VEs, tanto em termos de concentração de partículas quanto de tamanho (Figuras 15C-D).

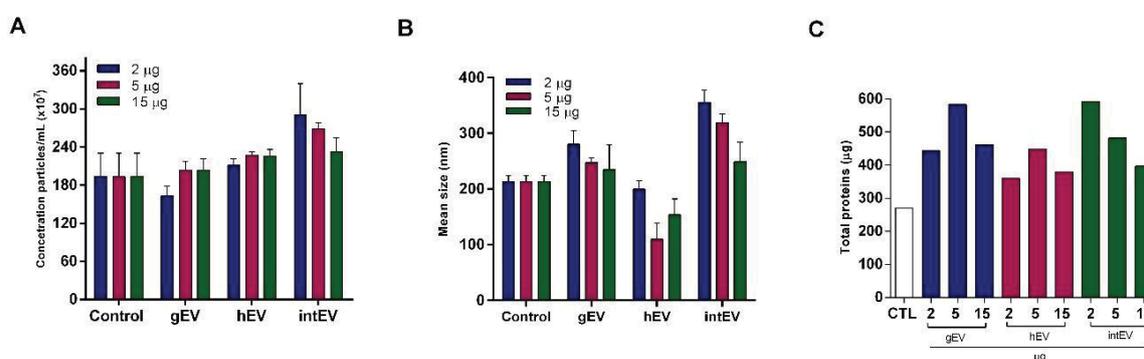
Figura 15 – Avaliação da liberação de vesículas extracelulares (VEs) por *G. intestinalis* em resposta à VEs exógenas



A-B) Concentração de partículas e tamanho das VEs liberadas por *G. intestinalis* após incubação com 7 µg de gEV, hEV e intEV durante 1 h. C-D) Concentração de partículas e tamanho das VEs obtidas da cinética da liberação de VEs após 5, 30 e 60 min após incubação com gEV e hEV. Dados representados como média ± erro padrão.

Em seguida, exploramos se a liberação de VEs pelo parasita seria dose-dependente em resposta ao estímulo por gEV, hEV ou intEV, ao longo de 1 hora. Observou-se uma dose dependência na liberação de VEs em relação às diferentes concentrações, especialmente quando expostas ao intEV (Figura 16A). Notavelmente, o tamanho das VEs liberadas pelo parasita aumentou após a exposição a gEV e intEV, mas, de forma interessante, a maior concentração de intEV induziu a liberação de VEs menores (Figura 16B). Adicionalmente, analisamos a concentração de proteínas nas VEs após a exposição às VEs exógenas e observamos um aumento frente à exposição das VEs em relação ao controle sem adição de VEs (Figura 16C).

Figura 16 – Efeito de vesículas extracelulares (VEs) exógenas na liberação de VEs por *G. intestinalis*

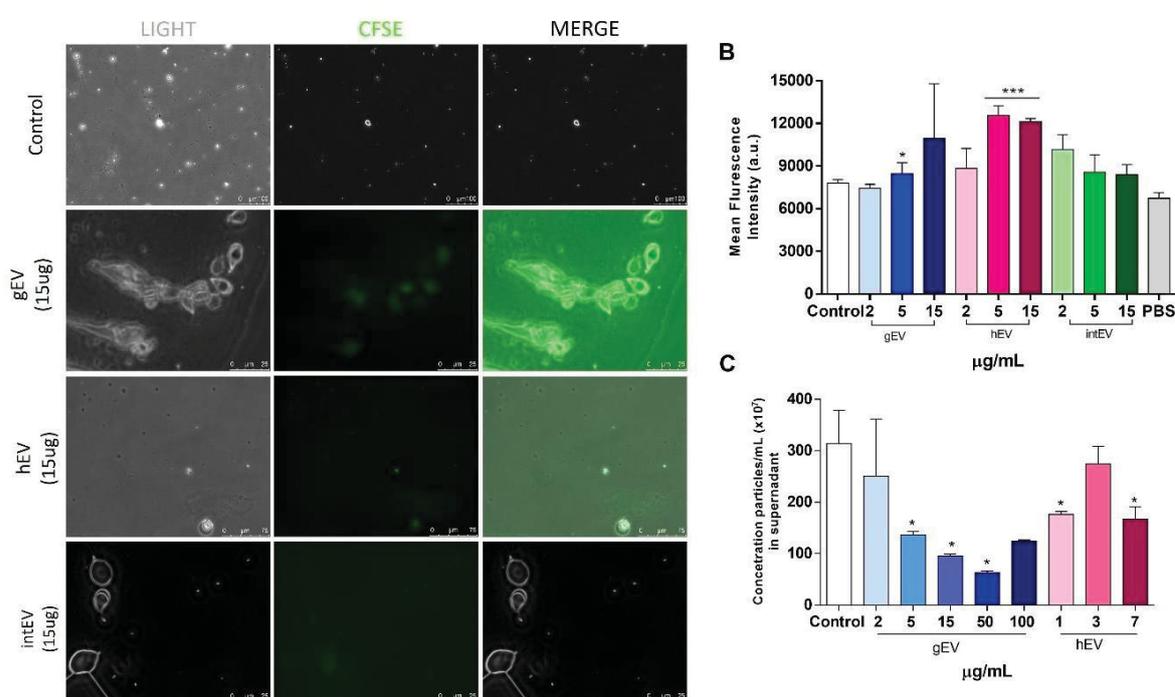


A) Concentração de partículas de VEs em resposta a 2, 5 e 15 µg de gEV, hEV ou intEV em 1 h. B) Tamanho das VEs obtidas da dose-dependência na liberação de VEs em resposta a 2, 5 e 15 µg de gEV, hEV ou intEV em 1 h. C) Concentração de proteínas nas VEs após exposição a gEV, hEV ou intEV em 1 h. Os resultados de A-F foram analisados por NTA.

Para avaliar o “uptake” de VEs no parasito, foram isoladas gEV, hEV e intEV e previamente marcadas com CFSE, incubadas sobre o parasita por 1 h. Após incubação, o sobrenadante foi centrifugado para isolar as VEs liberadas e os parasitas foram plaqueados/semeados em lamínulas/lâminas e observados por microscopia de fluorescência. Utilizando concentrações de VEs de 2, 5 e 15 µg, apenas a maior concentração foi identificada pela técnica de microscopia, onde foi possível observar qualitativamente a internalização das VEs pelo parasita (Figura 17A). Além da microscopia de fluorescência, nós decidimos testar as mesmas concentrações de VEs por fluorimetria. Observamos que hEV e gEV foram internalizadas na concentração de 5 e 15 µg, o que não foi observado para intEV em relação ao controle na ausência de VEs (Figura 17B). O método não foi o suficiente para determinar com exatidão a concentração de VEs internalizadas. Por estas razões, decidimos, dentro do balanço entre biogênese e “uptake”, considerar o sobrenadante das gEV e hEV como as VEs

que não foram internalizadas durante a incubação pela técnica de NTA. Surpreendentemente, o “uptake” de gEV foi dose-dependente até 50  $\mu\text{g}$  e a partir de 100  $\mu\text{g}$  há possivelmente uma saturação do “uptake” devido a maior detecção de VEs no sobrenadante. No entanto, os resultados comparativos com as hEV mostram que com concentrações menores não há uma dose dependência, indicando que talvez existam diferenças na internalização de VEs de diferentes origens, sendo não favorecida a internalização de vesículas do hospedeiro no parasita (Figura 17C).

Figura 17 – *G. intestinalis* internaliza preferencialmente VEs próprias

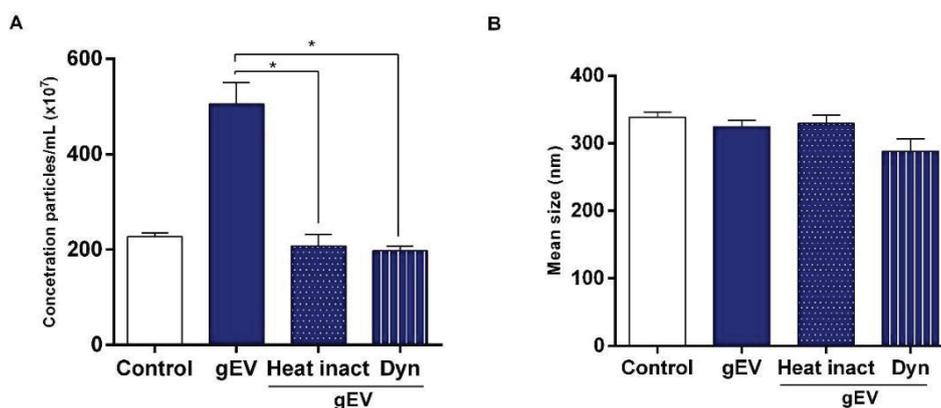


A) Microscopia de fluorescência da internalização de gEV, hEV e intEV marcadas com CFSE em *G. intestinalis*. B) Intensidade de fluorescência de gEV, hEV e intEV marcadas com CFSE analisadas por fluorimetria. C) Concentração de partículas liberadas por *G. intestinalis* após incubação com 2, 5, 15, 50 e 100  $\mu\text{g}$  de gEV e 1, 3 e 7  $\mu\text{g}$  de hEV analisadas por NTA.

Para investigar os mecanismos envolvidos no “uptake” das VEs por *G. intestinalis*, buscamos avaliar se esse processo poderia ser bloqueado por inibidores específicos de endocitose testados anteriormente em células hospedeiras. Para isso, VEs previamente isoladas e quantificadas foram incubadas com o parasita na presença ou ausência de inibidores de “uptake” por uma hora e posteriormente analisamos no sobrenadante a presença de VEs. Demonstramos que *G. intestinalis* responde ao estímulo com VEs aumentando sua própria liberação de vesículas, e que

esse efeito é bloqueado pela adição de Dynasore, um inibidor de dinamina e não há estímulo de liberação de vesículas quando as vesículas foram inativadas pelo calor (Figura 18A). Paralelamente, demonstramos que o tamanho das VEs não foi alterado com a adição de VEs (Figura 18B).

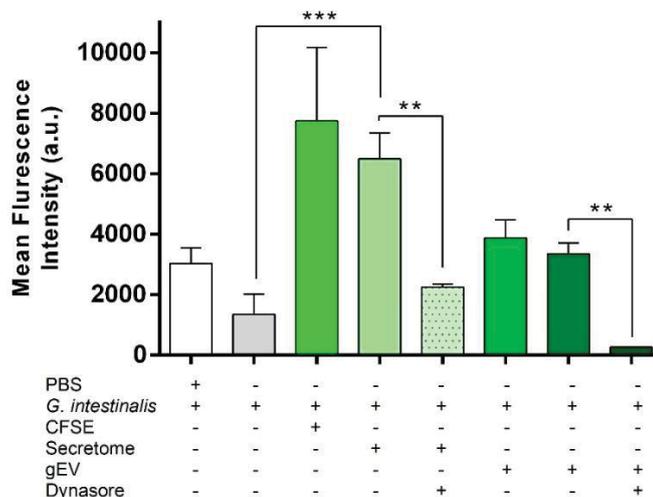
Figura 18 – O “uptake” de vesículas extracelulares por *G. intestinalis* ocorre pelo mecanismo de dinamina-dependente



A) Concentração de partículas analisadas por NTA após adição de 2 µg de VEs de *G. intestinalis* e incubada durante 1 h sobre o parasita. As VEs foram isoladas em condições normais, inativas por calor (Heat inactivated) e na presença de 100 µM de Dynasore. B) Tamanho médio das VEs obtidas condições normais, inativas por calor (Heat inactivated) e na presença de 100 µM de Dynasore.

Em seguida, para avaliar a especificidade do “uptake” de VEs por *G. intestinalis*, investigamos se o parasita seria capaz de incorporar VEs presentes no secretoma de parasitas marcados com CFSE ou VEs previamente isoladas e marcadas. No experimento, o secretoma coletado após 1 h de incubação de parasitas marcados foi transferido para parasitas não marcados, permitindo a avaliação da internalização de VEs. Em outra abordagem, VEs previamente isoladas e marcadas com CFSE foram incubadas com parasitas não marcados. Ambas as condições foram realizadas na presença ou ausência de Dynasore para testar o efeito inibitório na internalização.

Os resultados demonstraram que *G. intestinalis* é capaz de internalizar tanto as VEs presentes no secretoma quanto as VEs previamente isoladas. A adição de Dynasore bloqueou significativamente a internalização em ambas as condições, indicando que a internalização de VEs pelo parasita é um processo dinamina-dependente (Figura 19). Esses achados reforçam o papel da comunicação célula-célula entre parasitas mediada por VEs.

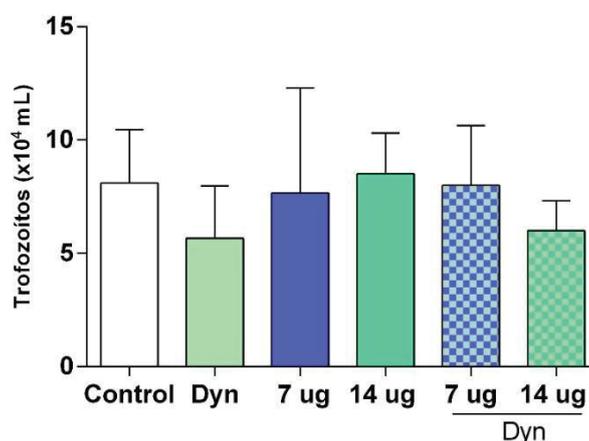
Figura 19 – Comunicação parasita-parasita mediada por vesículas de *G. intestinalis*

Intensidade média de fluorescência (a.u.) foi avaliada para determinar o “uptake” de VEs marcadas com CFSE em diferentes condições experimentais. O secretoma de parasitas previamente marcados ou VEs isoladas e marcadas com CFSE foram incubados com parasitas não marcados, na presença ou de Dynasore. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão;  $p < 0,01$  ( ),  $p < 0,001$  (\*).

A adesão de *G. intestinalis* às células hospedeiras é um processo essencial para o estabelecimento da infecção. Como nossos resultados demonstraram que a internalização de VEs pelo parasita é dinamina-dependente, decidimos investigar se a inibição desse processo afetaria a capacidade de adesão do parasita. Para isso, tratamos *G. intestinalis* com Dynasore na presença de diferentes concentrações de VEs e avaliamos seu efeito na adesão às células hospedeiras em 3 h.

Os resultados indicam que, na presença de VEs, a adição de Dynasore individualmente ou combinado com VEs do parasita induz uma redução a adesão do parasita. Esse achado reforça a hipótese de que as VEs exercem um papel importante na comunicação celular e no comportamento do parasita (Figura 20).

Figura 20 – A inibição da internalização de ves reduz a adesão de *G. intestinalis* às células hospedeiras



Ensaio de adesão de *G. intestinalis* sobre células Caco-2, após o tratamento com Dynasore (100  $\mu$ M) na presença de diferentes concentrações de gEVs (7 e 14  $\mu$ g). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ASSOCIADOS A INTERAÇÃO PARASITO CÉLULA HOSPEDEIRA

##### Incorporação de lipídios (Palmitato)

As vesículas extracelulares são compostas por diversas biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos. Entre esses componentes, os lipídios não apenas compõem a estrutura da membrana das VEs, mas também podem influenciar sua biogênese, fusão e interação com células-alvo. Portanto, a análise do perfil lipídico das VEs pode fornecer evidências importantes sobre suas funções biológicas, especialmente no contexto da interação patógeno-hospedeiro.

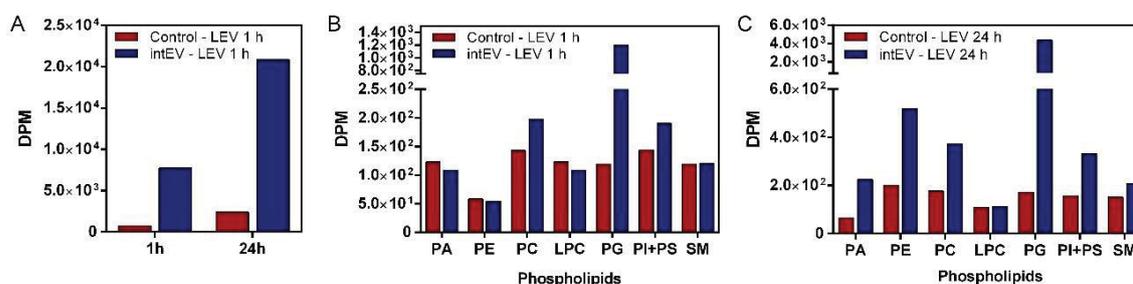
Para compreender melhor a composição lipídica das VEs geradas durante a interação entre *G. intestinalis* e células Caco-2, avaliamos a incorporação de lipídios nessas vesículas utilizando [<sup>3</sup>H]-palmitato como precursor lipídico. Investigamos duas subpopulações de VEs: vesículas extracelulares grandes (LEVs), e vesículas extracelulares pequenas (SEVs). Para entender a mobilização de lipídios durante a interação entre *G. intestinalis* e as células Caco-2 para a formação de vesículas extracelulares, decidimos analisar as LEVs e SEVs das células controle Caco-2 e as LEVs e SEVs das vesículas extracelulares da interação com o parasita (intEV).

Os resultados demonstraram um aumento na incorporação de lipídios totais nas intEVs em comparação com as VEs controle, indicando uma modificação lipídica associada à interação parasitária. Esse efeito foi mais evidente após 24 h do que após 1 hora de interação, em ambas as subpopulações analisadas (Figura 21 e 22A).

A fim de caracterizar quais classes lipídicas estavam enriquecidas nessas vesículas, realizamos a identificação de oito classes principais de fosfolipídios: ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), além da esfingomielina (SM) e da lisofosfatidilcolina (LPC).

Nas LEVs, observamos que, após 1 hora de interação, houve um aumento na incorporação de PC, PG e PI+PS em comparação com as VEs controle (Figura 21B). Após 24 h, além da elevação dessas mesmas classes lipídicas, identificamos um aumento também em PE e PA, sugerindo um enriquecimento lipídico progressivo ao longo do tempo de interação (Figura 21C).

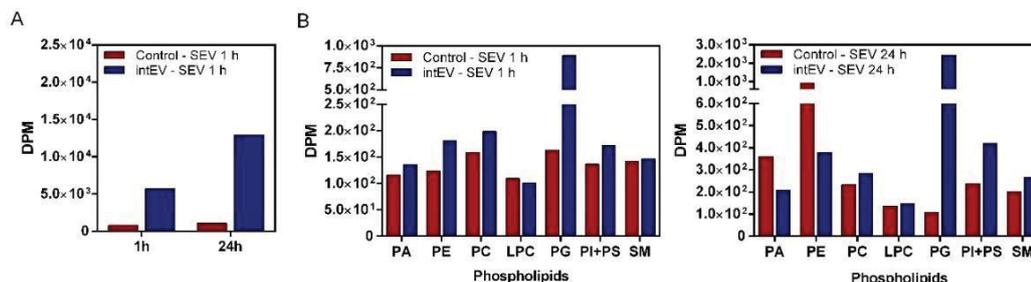
Figura 21 – Dinâmica de incorporação de lipídios durante a interação patógeno-hospedeiro (LEV) em 1 e 24 h



Quantificação de lipídios totais em 1 e 24 h de células sem interação (controle EV) e na interação parasita-hospedeiro (intEV) de LEVs (A). Principais fosfolipídios: Ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), esfingomielina (SM), lisofosfatidilcolina (LPC).

Já nas SEVs, a análise revelou um padrão distinto de incorporação lipídica. Após 1 hora, foi identificado um aumento expressivo em PG (Figura 22B). No entanto, após 24 h de interação, além do aumento em PG e PI+PS, verificamos uma redução nas quantidades de PA e PE (Figura 22C), indicando uma possível redistribuição dessas classes lipídicas ao longo do tempo.

Figura 22 – Dinâmica de incorporação de lipídios durante a interação patógeno-hospedeiro (SEV) em 1 e 24 h



Quantificação de lipídios totais em 1 e 24 h de células sem interação (controle EV) e na interação parasita-hospedeiro (intEV) de SEVs (A). Principais fosfolipídios: Ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), esfingomiéline (SM), lisofosfatidilcolina (LPC).

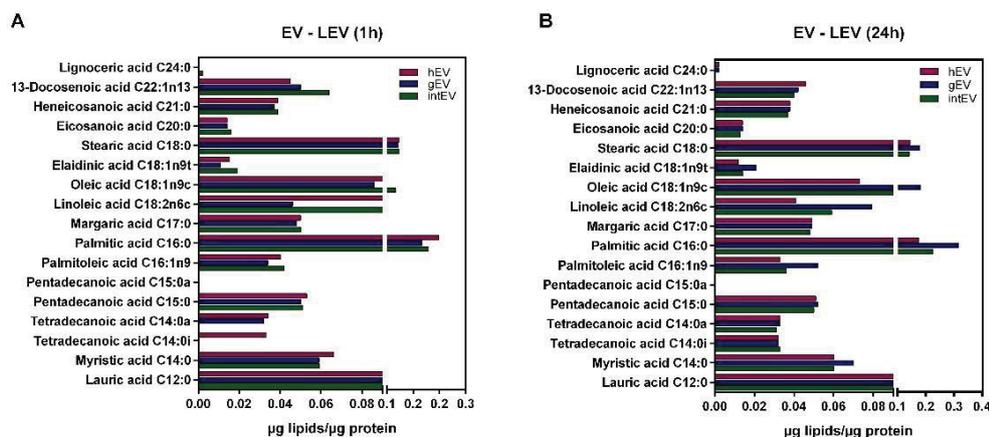
### Perfil lipídico em *G. intestinalis* e vesículas extracelulares da interação parasita-hospedeiro

Além disso, vesículas extracelulares (gEV, hEV e intEV) foram isoladas e analisadas por espectrometria de massas para caracterização de sua composição lipídica. A análise revelou diferenças marcantes no perfil de ácidos graxos entre os diferentes tipos de vesículas, tempos de coleta (1 h e 24 h) e subpopulações de VEs (LEV e SEV).

Nas LEVs de 1h, observamos que as gEVs apresentaram maior abundância de ácidos graxos saturados, como ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0) e ácido palmítico (C16:0), sendo este último o mais prevalente. Já nas hEVs e intEVs, os níveis desses ácidos graxos foram similares, com destaque para a maior concentração de ácido palmítico (C16:0) nas hEVs e um leve enriquecimento de ácido oleico (C18:1n9c) e ácido linoleico (C18:2n6c) nas intEVs, sugerindo um possível papel na interação parasita-hospedeiro (Figura 23A).

Após 24h, as gEVs mantiveram níveis elevados de ácido palmítico (C16:0), enquanto os ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico (C18:2n6c), diminuíram nas hEVs. As intEVs mantiveram um perfil lipídico semelhante ao observado em 1h, mas com um leve aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido docosenoico (C22:1n13) (Figura 23B).

Figura 23 - Perfil lipídico das vesículas extracelulares grandes, LEVs, derivadas de *G. intestinalis* (gEV), células hospedeiras (hEV) e da interação (intEV) em 1 e 24 h de incubação

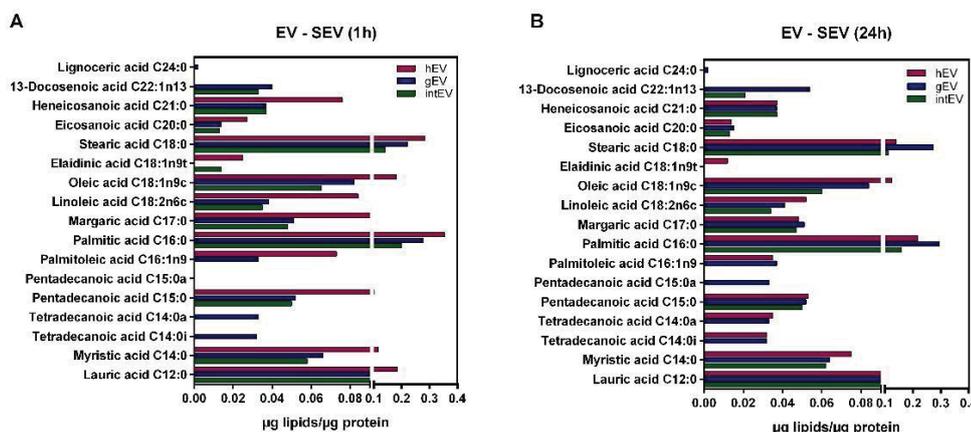


Composição de ácidos graxos das LEVs, quantificados após 1 hora (A) e 24 h (B), expressa em µg de lipídios por µg de proteína.

Nas SEVs de 1h, os perfis lipídicos foram semelhantes aos das LEVs, com as gEVs apresentando alta concentração de ácidos graxos saturados, principalmente ácido palmítico (C16:0), enquanto as hEVs e intEVs exibiram maior diversidade lipídica. As intEVs mostraram um enriquecimento de ácidos graxos insaturados, como ácido oleico (C18:1n9c) e ácido linoleico (C18:2n6c), possivelmente refletindo a influência da interação entre *Giardia* e células hospedeiras (Figura 24A).

Já nas SEVs de 24h, houve uma leve redução dos ácidos graxos saturados na gEVs, enquanto as hEVs apresentaram maior concentração de ácidos graxos insaturados, sugerindo um possível ajuste na composição lipídica ao longo do tempo. As intEVs continuaram apresentando altos níveis de ácido palmítico (C16:0), mas com um aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia longa (Figura 24B).

Figura 24 – Perfil lipídico das vesículas extracelulares pequenas, SEVs, derivadas de *G. intestinalis* (gEV), células hospedeiras (hEV) e da interação (intEV) em 1 e 24 h de incubação



Composição de ácidos graxos das SEVs, quantificados após 1 hora (A) e 24 h (B), expressa em µg de lipídios por µg de proteína.

Perfil proteômico das vesículas de *G. intestinalis* e da interação parasita-hospedeiro

#### 4.4.1.1 Proteômica das vesículas extracelulares

Resultados prévios indicaram que, ao padronizar a produção de VEs por um período de uma hora, as concentrações de proteínas obtidas eram semelhantes entre as diferentes VEs, mesmo tendo uma concentração de moléculas diferentes. Isto nos fez pensar que poderiam existir diferenças no cargo entre os diferentes tipos de VEs. Para explorar essa hipótese, gEVs, hEVs e intEVs liberadas após 1 e 24 h foram analisadas por proteômica baseada em espectrometria de massas, permitindo a identificação e quantificação dos componentes proteicos presentes nas vesículas. Essa abordagem nos permitiu avaliar a possibilidade de existir potenciais funções biológicas distintas para cada população de vesículas.

Durante a análise proteômica das VEs, identificamos um total de 815 proteínas, das quais apenas 9,8% eram de origem humana. Observamos uma maior variedade e quantidade de proteínas nas VEs coletadas após 24 h, em comparação com aquelas coletadas no tempo inicial (1 h), para todos os grupos de VEs analisados. A análise comparativa destaca que, nas primeiras horas, as vesículas refletem uma resposta inicial, com o parasita focando em adesão e preparação para interação, enquanto o hospedeiro ainda não apresenta uma resposta clara. Com o avanço para 24 h, ocorre uma modulação significativa no conteúdo proteico das vesículas. As gEVs e intEVs revelam uma resposta adaptativa mais ativa, com proteínas associadas ao estresse, modulação imune e persistência, evidenciando a complexidade da interação parasita-hospedeiro. As hEVs, por outro lado, demonstram uma resposta mais tardia e menos intensa, possivelmente devido à manipulação parasitária.

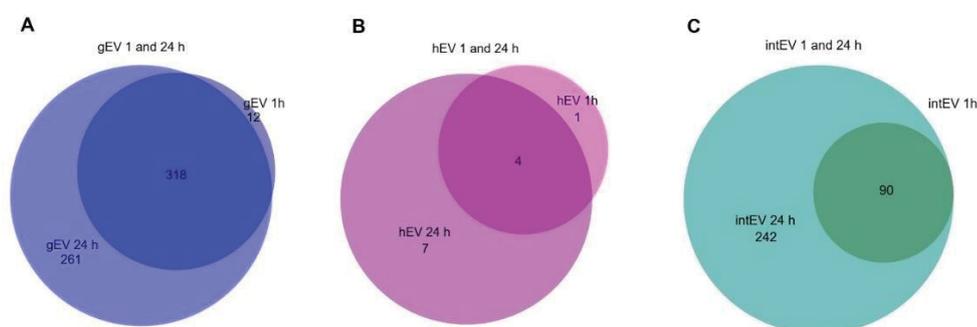
#### 4.4.1.2 Análise qualitativa das proteínas obtidas de vesículas extracelulares

A análise qualitativa revelou diferenças na composição proteica entre os tempos de coleta e entre os diferentes tipos de VEs. As gEVs apresentaram 318 proteínas (53,8%) compartilhadas entre 1 h e 24 h, enquanto 12 proteínas (2%) foram exclusivas das gEVs de 1 h e 261 proteínas (44,2%) exclusivas das gEVs de 24 h (Figura 25A). Esse aumento na diversidade proteica ao longo do tempo pode estar associado a sinais biológicos que demandam um período maior para serem processados, considerando o turnover de RNAs, a síntese de proteínas e o seu

processamento via VEs. Nas hEVs, apenas 4 proteínas foram compartilhadas entre os tempos de 1 h e 24 h, com 1 proteína exclusiva das hEVs de 1 h e 7 proteínas exclusivas das hEVs de 24 h (Figura 25B), indicando um enriquecimento proteico gradual, possivelmente influenciado por mecanismos de resposta ao estresse celular e à interação com o parasita. Já as intEVs apresentaram 90 proteínas (27,1%) compartilhadas entre 1 h e 24 h, enquanto 242 proteínas (72,9%) foram exclusivas das intEVs de 24 h (Figura 25C). Esse aumento expressivo pode estar relacionado à resposta adaptativa do parasita, em que a maquinaria parasitária intensifica a produção de proteínas específicas para promover a persistência e a evasão do sistema imune do hospedeiro.

A sobreposição parcial das proteínas compartilhadas entre os diferentes tempos sugere que, apesar das mudanças na composição proteica ao longo do tempo, algumas proteínas essenciais persistem, possivelmente desempenhando papéis fundamentais na biogênese e nas funções biológicas das VEs durante a interação parasita-hospedeiro.

Figura 25 – Comparação das proteínas identificadas nas vesículas extracelulares em 1 e 24 h.



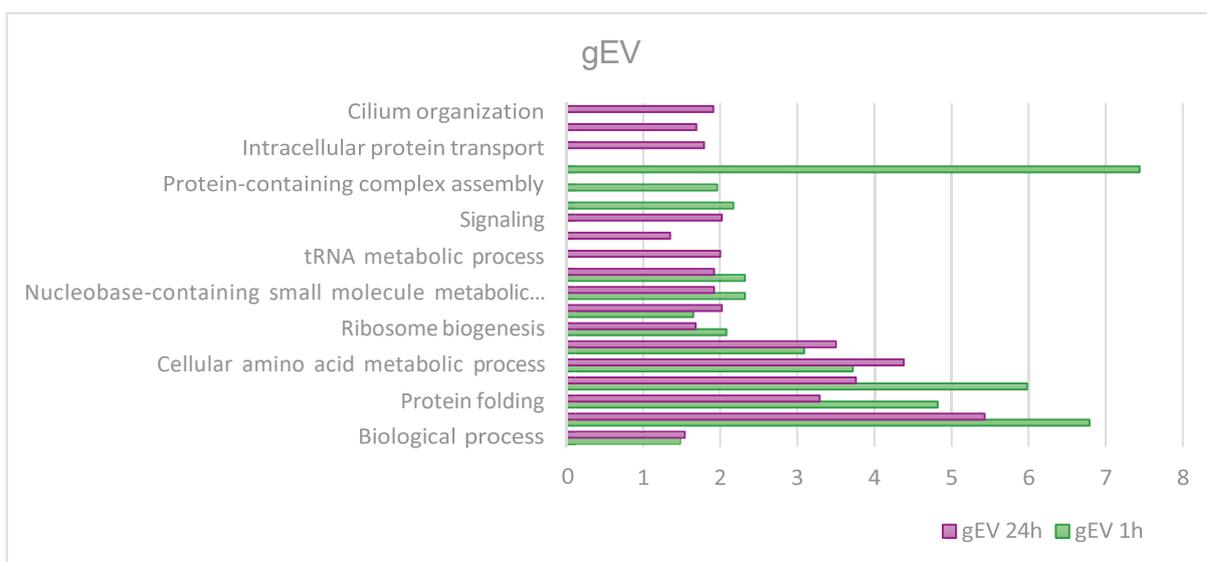
Diagramas de Venn representando a sobreposição das proteínas identificadas nas diferentes populações de VEs em tempos de 1 e 24 h. (A) Proteínas identificadas nas gEVs. (B) Proteínas identificadas nas hEVs. (C) Proteínas identificadas nas intEVs. Os números indicam a quantidade de proteínas exclusivas ou compartilhadas entre os tempos analisados.

#### 4.4.1.3 Funcionalidade das proteínas das VEs durante a interação parasita-hospedeiro

Ao analisarmos os processos biológicos associados às VEs, identificamos distintas composições funcionais nas gEVs ao longo do tempo através da ontologia gênica (Gene ontology – GO). Nas gEVs coletadas após 1 h, predominavam proteínas relacionadas a processos essenciais, como a localização na membrana plasmática, translocação citoplasmática, dobramento de proteínas e geração de

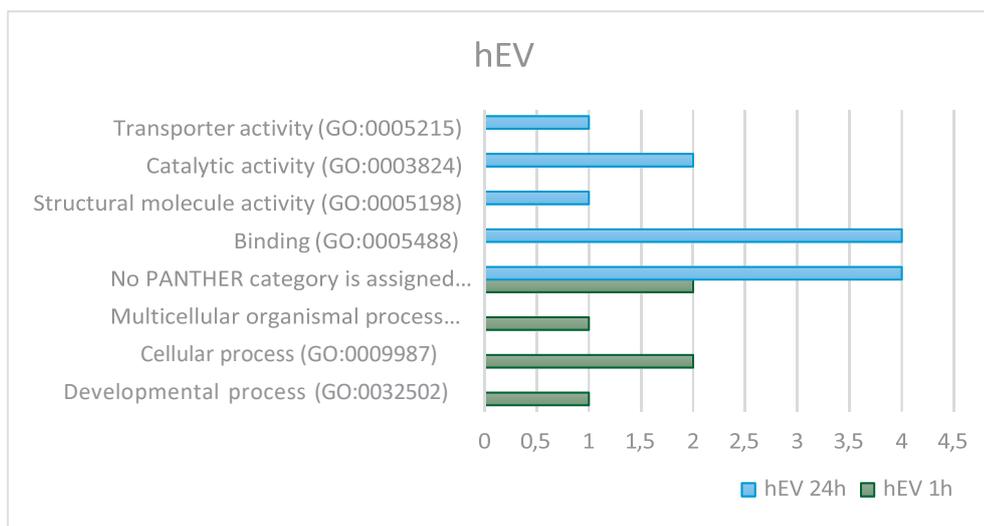
precursores metabólicos e energia. Esses processos refletem atividades iniciais do parasita, voltadas para a adaptação rápida ao ambiente e manutenção de funções metabólicas básicas. Por outro lado, nas gEVs coletadas após 24 h, além da presença contínua de proteínas associadas aos processos já identificados no primeiro tempo de coleta, observamos um enriquecimento funcional com a identificação de proteínas exclusivas. Essas proteínas estavam relacionadas transporte intracelular de proteínas, metabolismo de tRNA e sinalização celular (Figura 26). Esse perfil sugere que, ao longo do tempo, ocorre uma complexificação nas funções desempenhadas pelas VEs, possivelmente como resposta a interações mais prolongadas com o ambiente hospedeiro e à necessidade de adaptar mecanismos de sobrevivência e persistência.

Figura 26 – Análise funcional de proteínas associadas a gEVs em diferentes tempos de incubação (1 e 24 h)



Nas hEVs de 1 h, os principais processos biológicos envolvidos foram processos de desenvolvimento, processos celulares e processos de organismo multicelular, refletindo atividades que ocorrem nas fases iniciais da interação das vesículas com as células hospedeiras. Por outro lado, nas hEVs de 24 h, destacaram-se os processos de ligação, atividade de molécula estrutural, atividade catalítica e atividade de transportador (Figura 27). Essa análise evidencia uma alteração no perfil funcional das hEVs ao longo do tempo, sugerindo que suas funções biológicas variam conforme a tempo de liberação de VEs.

Figura 27 – Análise funcional de proteínas associadas a hEVs em diferentes tempos de incubação (1 e 24 h)

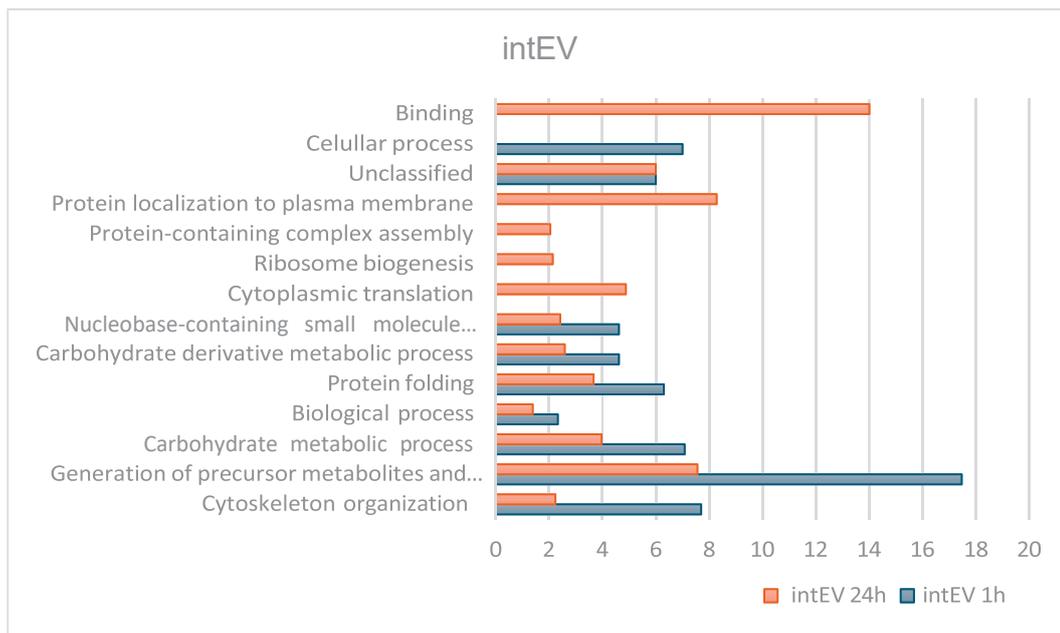


Nas intEVs de 1 hora, predominavam proteínas associadas à organização do citoesqueleto, dobramento de proteínas e geração de precursores metabólicos e energia. Essas funções refletem respostas celulares iniciais, possivelmente relacionadas à adaptação imediata ao ambiente de interação.

Após 24 h, além da manutenção dessas proteínas, observamos a presença de proteínas exclusivas relacionadas a processos de ligação, translocação citoplasmática e localização na membrana plasmática. Esse enriquecimento funcional ao longo do tempo pode indicar uma resposta adaptativa mais complexa, influenciada pelo prolongamento da interação entre o parasita e a célula hospedeira.

Interessantemente, alguns desses processos identificados nas intEVs de 24 h foram mais semelhantes aos observados nas gEVs, principalmente em relação à localização na membrana plasmática e à translocação citoplasmática. Esse padrão sugere uma possível influência do parasita na modulação da carga proteica das intEVs, potencialmente direcionada para favorecer mecanismos de persistência e evasão no ambiente hospedeiro. Assim, a interação prolongada pode desencadear sinais biológicos que modulam seletivamente a composição das intEVs, refletindo uma adaptação do parasita às condições impostas pelo hospedeiro (Figura 28).

Figura 28 – Análise funcional de proteínas associadas a intEVs em diferentes tempos de incubação (1 e 24 h)



Considerando que a maioria das proteínas presentes nas intEVs é proveniente da interação com *G. intestinalis*, realizamos uma análise comparativa entre as gEVs e intEVs nos tempos de 1 hora e 24 h. Observamos que as gEVs de 24 h apresentaram o maior número de proteínas (~235), evidenciando uma maior complexidade proteica associada ao prolongamento da interação. De forma interessante, as intEVs de 24 h demonstraram uma sobreposição significativa com as proteínas identificadas tanto nas gEVs de 1 hora quanto nas próprias intEVs de 1 h.

Essa sobreposição sugere que, ao longo do tempo, as intEVs começam a adquirir características proteicas semelhantes às gEVs no início da interação. Tal comportamento pode indicar que, após 24 h, as intEVs iniciam um processo adaptativo ao ambiente do hospedeiro, possivelmente moduladas por sinais biológicos que exigem maior tempo para serem processados. Isso pode envolver o turnover de RNAs, síntese de proteínas e seu processamento via vesículas extracelulares, levando a uma carga proteica mais complexa.

Além disso, a adaptação proteica observada nas intEVs pode refletir uma resposta ativa da maquinaria parasitária, intensificando a produção de proteínas para facilitar a persistência e evasão ao sistema imune do hospedeiro. Assim, as intEVs de 24 h podem estar assumindo funções mais complexas e adaptativas, semelhantes às observadas nas gEVs, o que reforça a hipótese de que a dinâmica da interação parasita-hospedeiro e o ambiente inflamatório influenciam diretamente a composição e o papel funcional dessas vesículas ao longo do tempo (Figura 29).

Figura 29 – Distribuição das proteínas identificadas nas gEVs e intEVs em 1 e 24 h

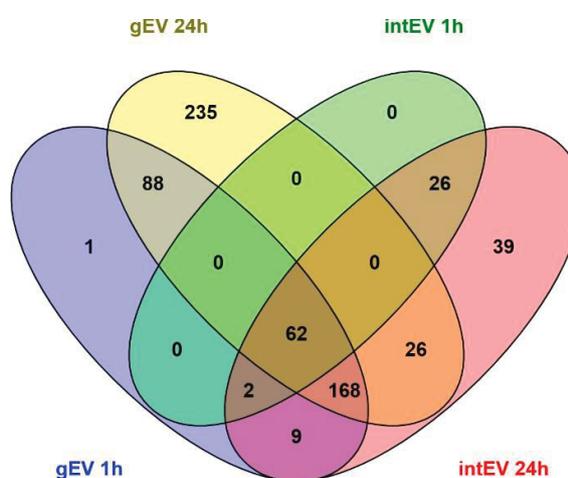


Diagrama de Venn representando a distribuição das proteínas identificadas nas vesículas extracelulares de *G.intestinalis* (gEVs) e vesículas da interação (intEVs) em diferentes tempos de coleta (1h e 24h). Cada cor corresponde a uma condição experimental: gEVs 1h (azul), gEVs 24h (amarelo), intEVs 1h (verde) e intEVs 24h (vermelho). Os números indicam a quantidade de proteínas exclusivas ou compartilhadas entre as condições.

Entre as principais proteínas presentes em gEVs em 1 hora estão: alfa-giardinas, proteínas ribossomais, VSPs. Em 24 h, além dessas proteínas, observamos a presença de arginina deiminase, ornitina transcarbamilase entre outras proteínas associadas a virulência do parasito.

Já as proteínas das intEVs em 1 hora estavam ligadas a processos de adesão e organização do citoesqueleto, indicando um início de interação e modulação mútua. E em 24 h, apresentaram uma mudança substancial em seu conteúdo, com o surgimento de proteínas relacionadas à modulação imune, resposta ao estresse e transporte intracelular. Isso sugere que, ao longo do tempo, as intEVs se tornam mais complexas, refletindo o avanço da interação parasita-hospedeiro e o esforço do parasita para persistir e modular o ambiente.

#### 4.4.1.4 Análise do perfil de expressão proteica das vesículas extracelulares

Para investigar se as células hospedeiras (Caco-2) geram uma resposta específica à interação com *G. intestinalis*, analisamos as proteínas exclusivamente de origem hospedeira presentes nas intEVs nos tempos de 1 e 24 h. Os resultados estão resumidos na Tabela 1, destacando proteínas que desempenham funções essenciais

em processos celulares fundamentais, como síntese de proteínas, metabolismo energético, adesão celular e transporte de oxigênio.

No entanto, identificamos apenas 12 proteínas diferencialmente expressas ao longo dos tempos de interação, e nenhuma delas apresentou uma associação clara com mecanismos de proteção do hospedeiro contra o patógeno. As proteínas identificadas foram: cadeia pesada de clatrina 1, fosfoenolpiruvato hidratase, L-lactato desidrogenase, GTPase nuclear Ran, aldolase frutose-bisfosfato, anexina A2, proteína de choque térmico HSP 90-beta, fator de alongação 2, cofilina-1, peptidil-prolil isomerase A, proteína principal do vault e proteína rica em prolina de queratinócitos.

Esses dados sugerem que, durante o período analisado, a resposta proteica do hospedeiro presente nas intEVs não indica um mecanismo efetivo de defesa contra o parasita. Isso pode reforçar a hipótese de que o parasita exerce uma modulação sobre o conteúdo das vesículas, influenciando o perfil proteico e, possivelmente, contribuindo para a evasão da resposta imune e para a persistência da infecção.

*Tabela 1 – Proteínas exclusivas da célula hospedeira (Caco-2) após 1 e 24 de interação com G. intestinalis*

<b>Proteína</b>	<b>1h</b>	<b>24 h</b>	<b>Principal função biológica</b>
Clathrin heavy chain 1	-	✓	Formação de vesículas e endocitose
Elongation factor 1-alpha	✓	✓	Facilita o alongamento de cadeias polipeptídicas durante a tradução
Histone H2A type 1-D	✓	✓	Estrutura e regulação da cromatina
Phosphopyruvate Hydratase	-	✓	Participa do metabolismo glicolítico
Globin domain-containing Protein	✓	✓	Transporte de oxigênio
L-lactate dehydrogenase	✓	✓	Conversão de piruvato em lactato no metabolismo energético

Pyruvate kinase	✓	✓	Conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato na glicólise
Apolipoprotein C-III	✓	✓	Metabolismo e transporte de lipídios
GTP-binding nuclear protein Ran	-	✓	Transporte nucleocitoplasmático e regulação da divisão celular
Joining chain of multimeric IgA and IgM	✓	✓	Estrutura e função das imunoglobulinas
Lactotransferrin	✓	✓	Transporte de ferro e defesa antimicrobiana
Ceruloplasmin	✓	✓	Transporte de cobre e atividade antioxidante
Alpha-globin	✓	✓	Componente da hemoglobina para transporte de oxigênio
Transferrin	✓	✓	Transporte de ferro no sangue
Actin, cytoplasmic 2	✓	✓	Estrutura e mobilidade celular
Fructose-bisphosphate Aldolase	-	✓	Metabolismo glicolítico
Amine oxidase [copper-containing] 2	✓	✓	Catalisa a desaminação de aminas primárias
L-lactate dehydrogenase A chain	✓	✓	Conversão de piruvato em lactato
Alpha-2-macroglobulin	✓	✓	Inibidor de proteases e regulação imune
Fibronectin	✓	✓	Adesão celular e manutenção da matriz extracelular
Tubulin beta-4A chain	-	✓	Componente do citoesqueleto
Annexin A2	-	✓	Modulação da membrana plasmática e sinalização celular

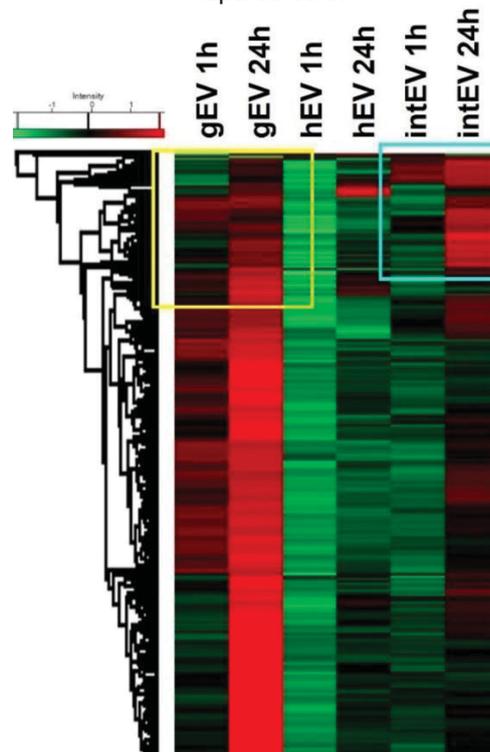
Tubulin beta chain, Tubulin beta-5 chain	-	✓	Componente do citoesqueleto
Heat shock protein HSP 90-beta	-	✓	Chaperona envolvida na estabilização de proteínas
Tubulin alpha-3C chain	✓	✓	Componente do citoesqueleto
Heat shock cognate 71 kDa protein	✓	✓	Chaperona envolvida no dobramento de proteínas
Elongation factor 2	-	✓	Facilita o alongamento de cadeias polipeptídicas durante a tradução
Putative heat shock 70 kDa protein 7	-	✓	Chaperona relacionada com o estresse celular
Cofilin-1	-	✓	Dinâmica do citoesqueleto de actina
Insulin-like growth factor- binding protein complex acid labile subunit	✓	✓	Modula a disponibilidade de fatores de crescimento
Lysozyme C	✓	✓	Enzima antibacteriana
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	✓	✓	Facilita o dobramento de proteínas
Major vault protein	-	✓	Transporte intracelular e possível papel na resposta imune
Keratinocyte proline-rich Protein	✓	✓	Participação na estrutura celular e adesão
Suprabasin	✓	✓	Proteção da epiderme e adesão celular

A análise do perfil de expressão proteica revelou diferenças entre os tempos de 1 hora e 24 h, com um aumento expressivo na quantidade e diversidade de proteínas após 24 h principalmente nas gEVs (destaque amarelo) e intEVs (destaque azul), observados na Figura 30. Esse aumento pode refletir uma resposta adaptativa ao prolongamento da interação parasita-hospedeiro. A lista detalhada das proteínas obtidas da análise proteômica pode ser visualizada no anexo I.

Nas intEVs de 24 h, a presença de proteínas associadas ao transporte intracelular, como cadeia pesada de clatrina 1 e proteína nuclear de ligação ao GTP Ran, sugere a ativação de processos endocíticos e de translocação de proteínas. O aumento de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, como fosfoenolpiruvato hidratase e aldolase frutose-bisfosfato, pode indicar uma maior demanda energética para sustentar processos celulares de defesa ou reparo. A identificação de chaperonas, como a proteína de choque térmico HSP 90-beta, aponta para uma resposta ao estresse celular.

De forma semelhante, o enriquecimento proteico nas gEVs de 24 h, incluindo proteínas associadas à adesão celular e ao citoesqueleto, como cadeia beta-4A de tubulina e anexina A2, sugere uma possível adaptação estrutural das vesículas ao longo do tempo pode indicar uma preparação do parasita para uma interação mais persistente com o hospedeiro. Esses resultados sugerem que, ao longo de 24 h, ocorre uma modulação na carga proteica das vesículas, possivelmente influenciada por sinais biológicos complexos relacionados à interação parasita-hospedeiro e ao ambiente inflamatório.

Figura 30 – Nível de expressão das proteínas nas gEV, hEV e intEV aos 1 e 24 h, por de mapa de calor



Mapa de calor representando os níveis de expressão das proteínas contidas nas vesículas extracelulares de *G. intestinalis* (gEV), do hospedeiro (hEV) e da interação (intEV) em 1 e 24 h. O destaque amarelo indica o aumento da expressão proteica em gEVs ao longo do tempo, enquanto o destaque azul aponta a variação na carga proteica das intEVs. A intensidade da coloração representa a abundância relativa das proteínas, variando de baixa (verde) a alta (vermelho).

Essas observações reforçam a importância das VEs como ferramentas estratégicas na comunicação parasita-hospedeiro. Compreender como essas vesículas modulam o ambiente e contribuem para a patogênese é crucial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que possam interromper esses processos e fortalecer a resposta do hospedeiro contra o parasita.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DO EPITÉLIO INTESTINAL EM CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS CACO 2 (3D)

##### 4.5.1 Formação do epitélio intestinal em 21 dias e caracterização das vesículas extracelulares

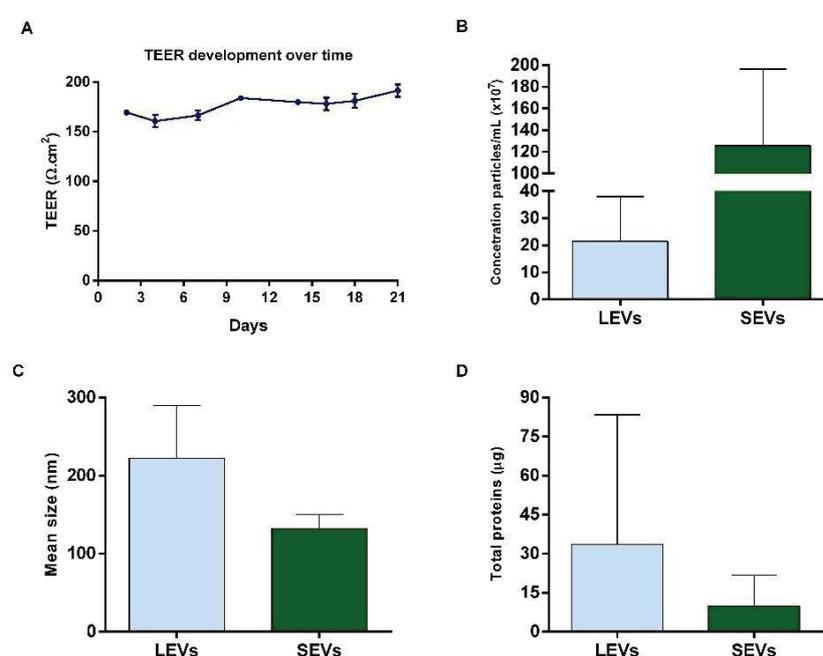
A infecção por *G. intestinalis* está associada à disfunção da barreira epitelial intestinal, comprometendo a integridade das junções celulares e aumentando a permeabilidade do epitélio. Nossa hipótese é que as VEs liberadas pelo parasito possam desempenhar um papel ativo nesse processo, modulando a resposta das células epiteliais e contribuindo para a quebra da barreira. Para investigar essa hipótese, utilizamos um modelo tridimensional (3D) de células Caco-2, que permite uma análise mais fisiológica das interações entre VEs e células hospedeiras.

Inicialmente, células Caco-2 foram cultivadas em um sistema *Transwell* por 21 dias para permitir sua diferenciação em um epitélio intestinal funcional. Após esse período realizamos a caracterização inicial das células Caco-2, através do acompanhamento da resistência elétrica transepitelial (TEER), da quantificação e caracterização das VEs liberadas e a determinação da concentração proteica (Figura 31).

A maturação da monocamada epitelial foi monitorada ao longo do tempo por meio da análise do TEER (Figura 31A). Observamos um aumento gradual da resistência ao longo dos 21 dias de cultivo, estabilizando em valores próximos a 200  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>. Esse dado indica a formação de junções celulares funcionais e reforça a adequação do modelo como barreira epitelial diferenciada. A quantificação das VEs por NTA revelou uma maior concentração de vesículas extracelulares pequenas (SEVs) em comparação com as vesículas extracelulares grandes (LEV) (Figura 31B).

Esse achado sugere que o microambiente celular favorece a liberação de vesículas menores, potencialmente associadas a mecanismos específicos de comunicação intercelular. O tamanho médio das vesículas demonstrou que as LEVs apresentaram diâmetro maior do que as SEV (Figura 31C). Além disso, o conteúdo proteico associado às vesículas extracelulares revelou uma maior concentração de proteínas nas LEV em comparação com as SEV (Figura 31D).

Figura 31 – Caracterização inicial das células Caco-2 cultivadas por 21 dias em um sistema tridimensional



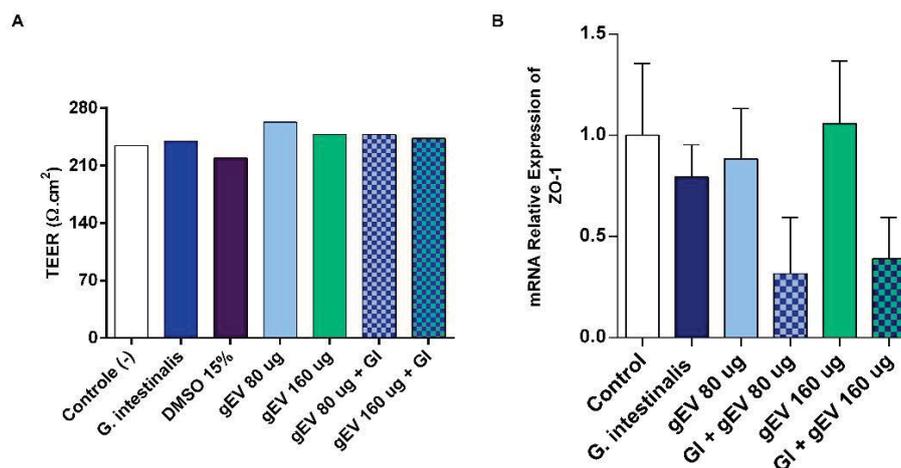
A) Desenvolvimento da resistência elétrica transepitelial (TEER) ao longo do tempo. (B) Concentração de vesículas extracelulares classificadas como grandes (LEVs) e pequenas (SEVs). (C) Tamanho médio das vesículas extracelulares. (D) Quantificação do conteúdo proteico associado às vesículas extracelulares. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.5.2 Impacto de *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares na barreira intestinal

Inicialmente, a investigação concentrou-se na avaliação da integridade da barreira epitelial, um indicador primário da resposta celular à infecção. A resistência elétrica transepitelial (TEER) foi mensurada para quantificar as alterações na barreira epitelial após exposição a *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares. Surpreendentemente, os resultados não mostraram alterações significativas na resistência epitelial, indicando que sob as condições testadas, nem o parasita nem suas vesículas comprometeram a integridade da barreira de forma detectável (Figura 32A). Contudo, uma análise mais detalhada da expressão do gene ZO-1, crucial para

a organização das tight junctions, revelou uma tendência à diminuição na sua expressão nos tratamentos combinados de vesículas e parasitas (Figura 32B), sugerindo uma possível modulação subcelular que não se refletiu nos testes de TEER. Não foram observadas diferenças na permeabilidade celular (dados não mostrados).

Figura 32 – Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal na presença *G. intestinalis* e de suas vesículas extracelulares

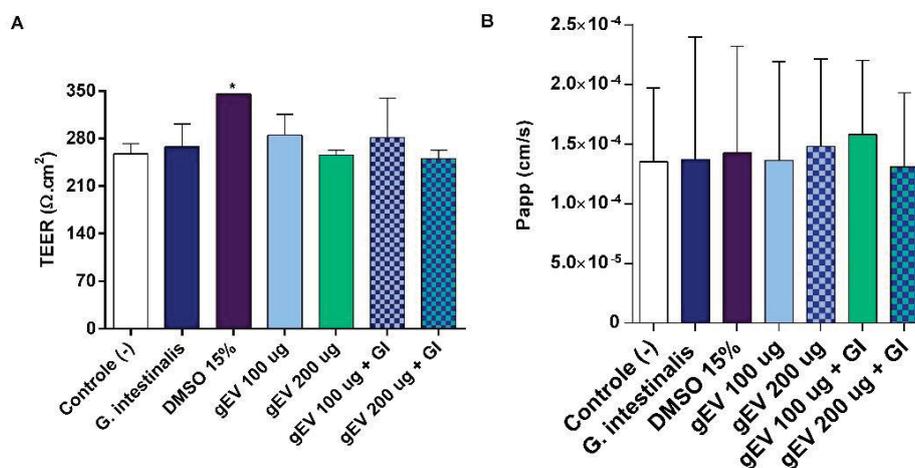


A) Resistência elétrica transepitelial (TEER) após diferentes incubações com *G. intestinalis*, gEV (80 e 160 ug) e *G. intestinalis* combinada com 80 e 160 ug de gEV (gEV + GI). (B) Expressão relativa do gene ZO-1 em células Caco-2 expostas a *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

#### 4.5.3 Resposta a concentrações elevadas de vesículas extracelulares

Procedendo a análise anterior, exploramos a resposta da barreira epitelial a concentrações elevadas de vesículas. Diferentes concentrações de gEV (100 e 200 ug) foram testadas para determinar se quantidades maiores poderiam exacerbá-las ou mitigar as alterações observadas anteriormente. Os dados de TEER não mostraram diferenças expressivas em resposta ao tratamento com gEV, ou a combinação de gEV e *G. intestinalis* independentemente da concentração utilizada (Figura 33A). A permeabilidade paracelular, avaliada pelo coeficiente Papp, também permaneceu inalterada em todos os tratamentos (Figura 33B). Este conjunto de resultados sugere que a barreira epitelial mantém sua funcionalidade mesmo na presença de altas concentrações de vesículas.

Figura 33 – Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal após tratamento com *G. intestinalis* e vesículas extracelulares do parasita através do coeficiente de permeabilidade aparente (Papp)

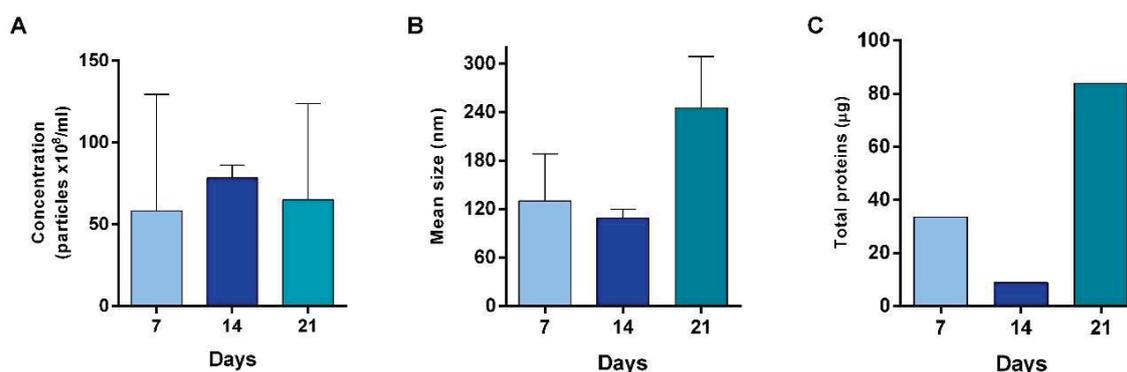


A) Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) das células Caco-2 diferenciadas por 21 dias e tratadas com *G. intestinalis*, gEV (100 µg ou 200 µg) ou ambos, e DMSO 15% (controle positivo) após 24 h. (B) Coeficiente de permeabilidade aparente (Papp). Os dados são expressos como média ± desvio padrão.

#### 4.5.4 Dinâmica temporal de liberação de vesículas durante a formação do epitélio intestinal

A pesquisa foi aprofundada com a análise da dinâmica temporal de liberação das vesículas durante o processo de diferenciação das células Caco-2, isoladas nos dias 7, 14 e 21. Utilizando análise de NTA observou-se que a concentração das vesículas permaneceu constante ao longo do tempo (Figura 34A), embora com um aumento expressivo no conteúdo proteico no dia 21 da diferenciação (Figura 34C). Em relação ao tamanho das VEs liberadas, nos estágios iniciais da diferenciação (dias 7 e 14), as VEs apresentam um diâmetro médio entre 100 e 150 nm, compatível com as SEVs. No entanto, no dia 21, o tamanho médio das VEs aumenta para aproximadamente 200 nm, caracterizando-as como LEVs (Figura 34B). Essas observações indicam uma possível adaptação na carga de vesículas relacionada ao estado de diferenciação celular, com implicações potenciais para a comunicação celular e a resposta a infecções.

Figura 34 – Liberação das vesículas extracelulares durante formação do epitélio intestinal



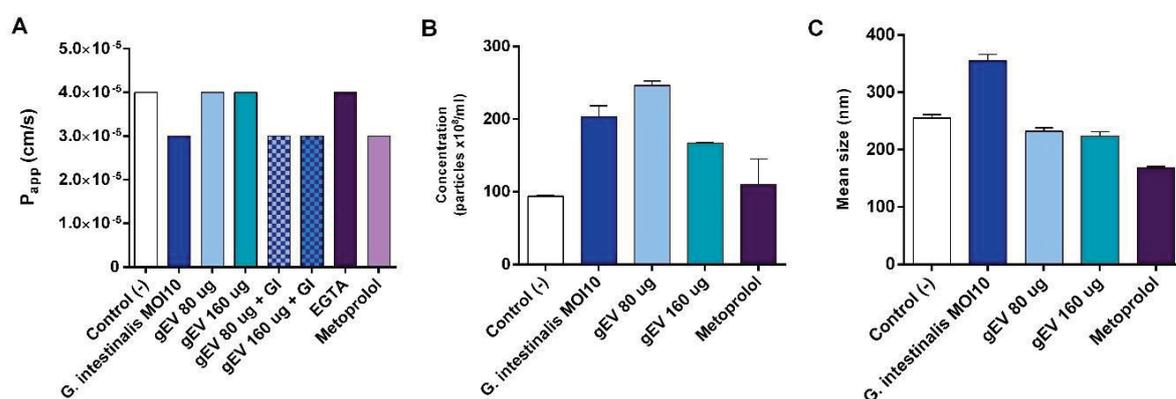
A) Análise das VEs isoladas dos dias 7, 14 e 21 da diferenciação das células Caco-2, avaliando a concentração de partículas por NTA (A), tamanho médio das vesículas (B) e concentração total de proteínas (C).

#### 4.5.5 Avaliação da permeabilidade celular após exposição a *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares

Para avaliar o impacto da exposição das células Caco-2 a *G. intestinalis* e suas VEs na integridade da barreira epitelial, a permeabilidade paracelular foi mensurada por meio do coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) após 48 h de incubação. Os resultados não indicaram alterações significativas na permeabilidade epitelial sob as condições testadas (Figura 35A), sugerindo que nem o parasita nem suas VEs comprometeram a barreira de forma detectável nesse período.

Dando continuidade à análise, investigamos a liberação de vesículas durante a interação entre células Caco-2 diferenciadas e *G. intestinalis* neste período de 48 h. As VEs liberadas foram isoladas e quantificadas, revelando, por meio da análise de NTA, um aumento expressivo na concentração dessas vesículas na condição de exposição ao parasita e suas VEs em comparação com o controle (Figura 35B). Além do aumento na concentração, avaliamos o tamanho destas VEs. Embora o tamanho médio das vesículas tenha variado entre os grupos experimentais, observamos que o contato do parasita com as células Caco-2 induziu a liberação de vesículas com diâmetro superior a 300 nm (Figura 35C), sugerindo um possível mecanismo de modulação na biogênese dessas estruturas.

Figura 35 – Avaliação da integridade da barreira epitelial intestinal após tratamento com *G. intestinalis* e vesículas extracelulares do parasita



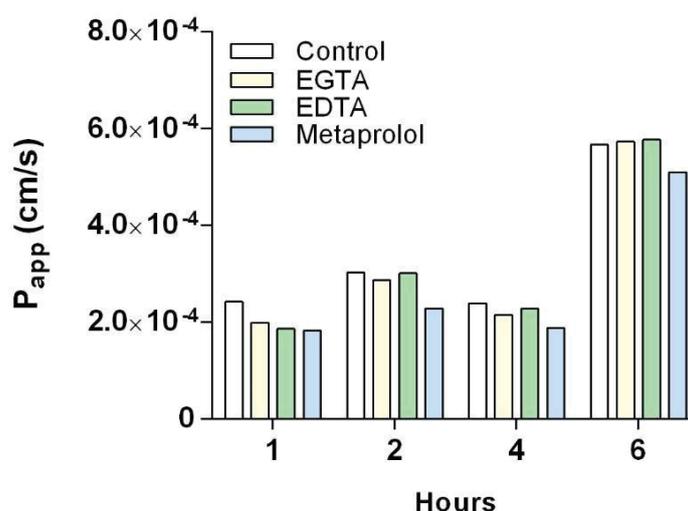
A) Permeabilidade celular aparente ( $P_{app}$ ) medida após 48h de tratamento com diferentes condições experimentais, incluindo *G. intestinalis*, gEVs isoladas e controle (EGTA e Metoprolol). Caracterização das VEs isoladas após 48h de interação parasita-hospedeiro, analisando a concentração de partículas por NTA (B) e tamanho médio das vesículas (C).

#### 4.5.6 Otimização do método para avaliar a permeabilidade celular do epitélio

Para superar as dificuldades encontradas na detecção da quebra da barreira epitelial nos experimentos anteriores, realizamos uma abordagem detalhada para avaliar a permeabilidade celular ao longo do tempo. A aplicação do método de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) não revelou de forma clara a perda de integridade das células Caco-2, apesar de outros ensaios indicarem alterações na barreira epitelial. Essa limitação poderia estar relacionada à sensibilidade do método, ao tempo de incubação ou à dinâmica dos compostos utilizados como marcadores de permeabilidade.

Para investigar essa questão, conduzimos um ensaio temporal de 6 h utilizando diferentes controles positivos de quebra da barreira epitelial: EGTA, EDTA e metoprolol. Durante as primeiras horas (1-4 h), a permeabilidade permaneceu relativamente estável e baixa em todas as condições testadas, sem diferenças significativas entre os grupos. No entanto, após 6 h, observamos um aumento expressivo da permeabilidade, especialmente nas condições tratadas com EGTA e EDTA. Com base nesses resultados, estabelecemos o EGTA como controle positivo para a quebra da barreira epitelial e padronizamos a avaliação da permeabilidade celular após 6 h de incubação com FITC-Dextran (Figura 36).

Figura 36 – Avaliação da permeabilidade epitelial ao longo do tempo e definição do controle positivo



Esta figura mostra a variação da permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) em função do tempo (h) para os grupos Controle, EGTA, EDTA e Metoprolol.

#### 4.5.7 Avaliação da formação e maturação do epitélio intestinal ao longo do tempo

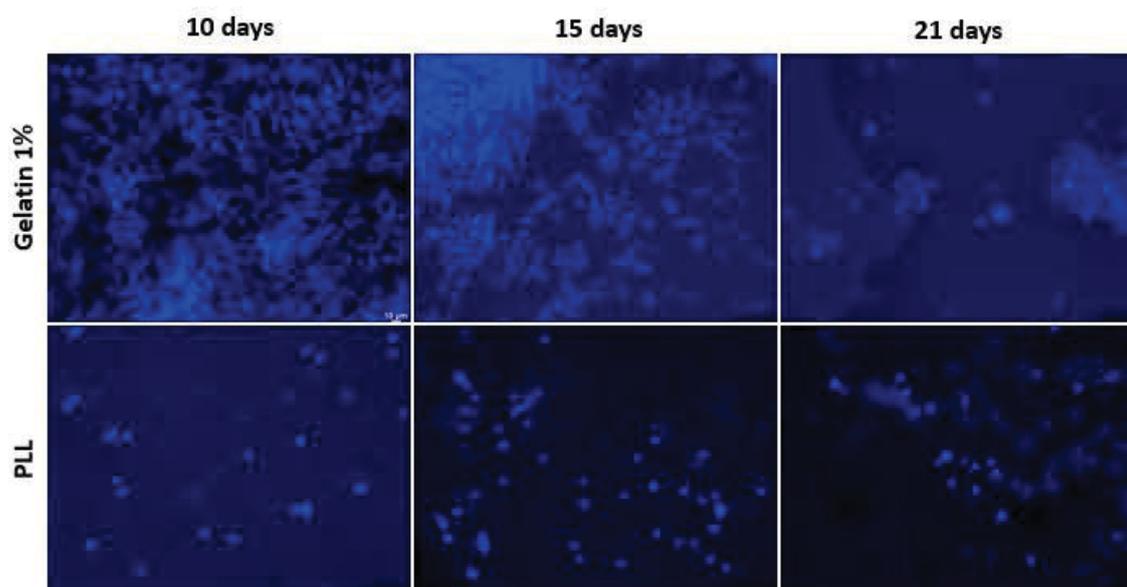
A maturação do epitélio intestinal *in vitro* é um fator crítico para a indução da quebra de barreira, e a literatura apresenta variações no tempo necessário para a diferenciação completa das células Caco-2, o que gera incertezas sobre a adequação do período de 21 dias. Para esclarecer essa questão, realizamos um acompanhamento da diferenciação epitelial, avaliando a densidade celular nos dias 10, 15 e 21.

Observações microscópicas anteriores indicaram que, aos 21 dias, as células não apresentavam a confluência ideal para a diferenciação completa, sugerindo que o epitélio não estava completamente formado (dados não mostrados). Para otimizar esse processo, testamos diferentes revestimentos de superfície (coatings), incluindo gelatina 1% e poli-L-lisina (PLL), a fim de melhorar a adesão e a maturação celular.

As células cultivadas em gelatina 1% apresentavam alta densidade celular em toda a superfície da membrana transwell, com formação de multicamadas, no dia 10. Porém, ao longo do tempo, observou-se uma redução progressiva na densidade celular, com células dispersas e crescimento desigual no dia 21. Em contraste, as células cultivadas em PLL apresentaram adesão deficiente e crescimento celular limitado tanto nas bordas quanto no centro da membrana, o que comprometeu a formação do epitélio (Figura 37). Esses resultados indicam que o tempo de diferenciação e as condições de cultivo podem influenciar diretamente a estruturação

da monocamada epitelial, sendo necessário uma padronização nas condições experimentais para garantir um modelo mais representativo do epitélio intestinal.

Figura 37 – Avaliação da densidade celular em membranas tratadas com gelatina 1% e PLL ao longo da diferenciação das células Caco-2



Micrografia de células Caco-2 diferenciadas durante 21 dias, utilizando superfícies tratadas com gelatina 1% e PLL. As células foram marcadas com DAPI para visualização dos núcleos e as ampliações utilizadas para captura das imagens – 20x.

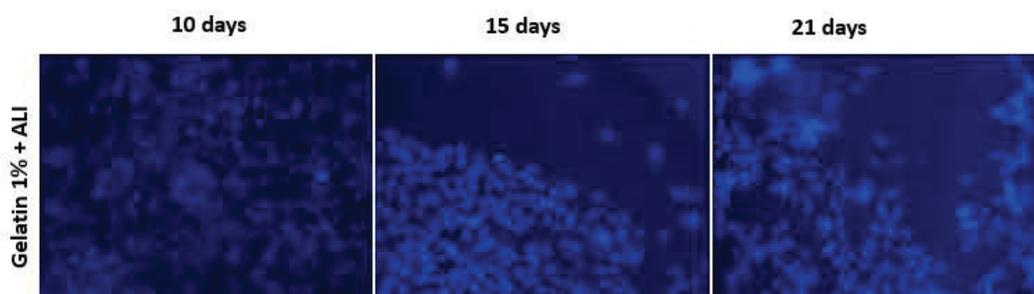
#### 4.5.8 Otimização do modelo de diferenciação celular com interface ar-líquido

Visando aprimorar a diferenciação celular e promover um crescimento mais homogêneo, implementamos uma metodologia baseada no estudo de He e colaboradores (2021). O modelo de interface ar-líquido (ALI) foi utilizado para simular de maneira mais fiel as condições fisiológicas, expondo a superfície apical das células ao ar, enquanto a região basal continuava em contato com o meio de cultura, o que favorece a diferenciação celular e melhora sua funcionalidade.

Adaptamos esse protocolo utilizando gelatina 1% como coating e privação de meio (método ALI) no compartimento apical foi realizado partir de 48 h de diferenciação. O cultivo foi monitorado até o 21º dia, com o objetivo de avaliar a formação e maturação do epitélio. No 10º dia de diferenciação, observamos um crescimento celular mais homogêneo por toda a membrana, o que nos permitiu hipotetizar a formação de um epitélio maduro. No entanto, com o passar dos dias,

observou-se uma diminuição na densidade celular (Figura 38), sugerindo que a diferenciação não se manteve de forma ideal ao longo do tempo, o que pode estar relacionado a fatores como a redução da disponibilidade de nutrientes ou o próprio processo de maturação celular.

Figura 38 – Diferenciação de células Caco-2 com privação de meio no compartimento apical



Micrografia de células Caco-2 diferenciadas durante 21 dias, utilizando superfícies tratadas com gelatina 1% e ALI. As células foram marcadas com DAPI para visualização dos núcleos e as ampliações utilizadas para captura das imagens – 20x.

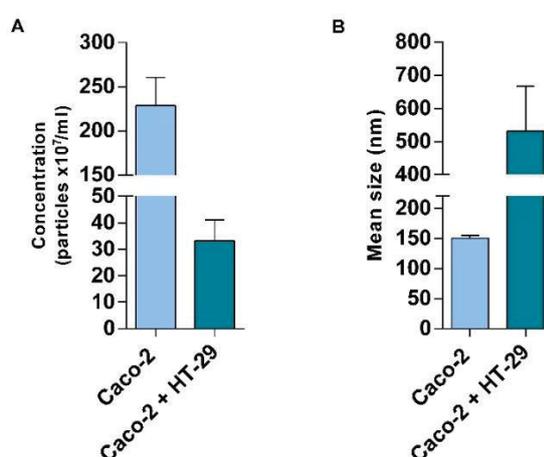
#### 4.5.9 Impacto da co-cultura na liberação de vesículas extracelulares

Para otimizar a avaliação da quebra do epitélio utilizando a permeabilidade aparente (Papp), ajustamos o protocolo para 10 dias de diferenciação, mantendo a privação de meio no compartimento apical e o coating com gelatina 1%. Além do cultivo isolado de células Caco-2, introduzimos a co-cultura com células HT-29, visando um modelo epitelial mais representativo, incorporando tanto células absorptivas quanto secretoras de muco, o que poderia conferir uma maior complexidade funcional ao sistema.

No primeiro momento, realizamos a caracterização das vesículas isoladas no 10º dia de diferenciação, analisando a concentração e tamanho por NTA. Os resultados obtidos para as células Caco-2 cultivadas isoladamente indicaram que, no 10º dia de cultivo, a liberação de VEs atingiu uma concentração média de aproximadamente  $220 \times 10^8$  partículas/mL (Figura 39A), com um diâmetro médio em torno de 150 nm (Figura 39B). Por outro lado, quando as células Caco-2 foram co-cultivadas com células HT-29, a concentração de vesículas liberadas foi consideravelmente menor, aproximadamente  $33 \times 10^8$  partículas/mL, e o tamanho médio das vesículas foi consideravelmente maior, atingindo cerca de 500 nm. Essa surpreendente diferença pode indicar que a interação entre os dois tipos celulares

modula o processo de liberação e composição das VEs. Além disso, o aumento no tamanho médio das vesículas pode indicar que essas VEs carregam uma carga molecular maior ou diferente, potencialmente desempenhando um papel distinto na comunicação intercelular.

Figura 39 – Caracterização das vesículas extracelulares liberadas por células Caco-2 isoladas e da co-cultura Caco-2/HT-29 no 10º dia de diferenciação



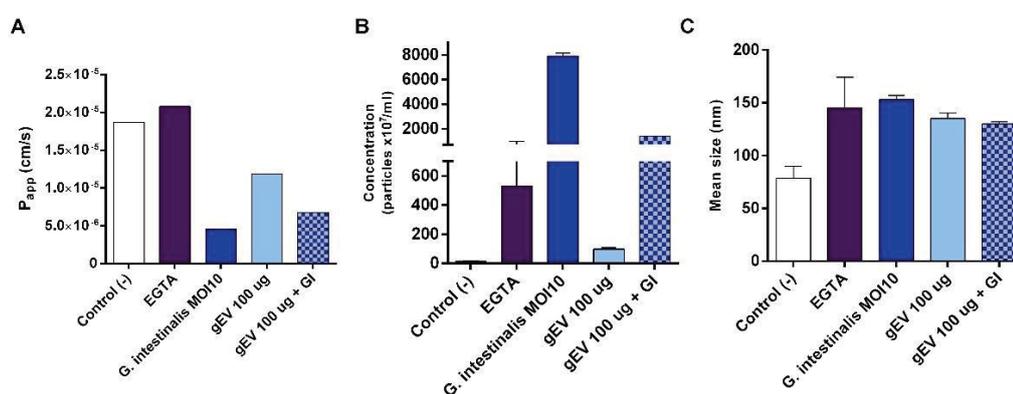
A) Concentração de vesículas extracelulares (partículas/mL) liberadas por células Caco-2 isoladas e da co-cultura Caco-2/HT-29 no 10º dia de cultivo. B) Tamanho médio das vesículas extracelulares liberadas por ambos os grupos, analisados por NTA.

#### 4.5.10 Impacto da co-cultura de *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares na permeabilidade celular

Em seguida, para investigar o impacto das VEs na integridade da barreira epitelial, adicionamos *G. intestinalis* (MOI 10), (gEVs) e a combinação de ambos às células epiteliais diferenciadas. A permeabilidade celular foi avaliada por meio da medida da permeabilidade aparente (Papp). Nos ensaios realizados em células Caco-2, observamos um aumento da Papp apenas no tratamento com EGTA, utilizado como controle positivo para a quebra da barreira epitelial. No entanto, a infecção com *G. intestinalis* e o tratamento com gEVs resultaram em uma redução da permeabilidade em comparação ao controle negativo (Figura 40A), o que poderia indicar um efeito compensatório ou resposta adaptativa das células epitelial à presença do parasita e VEs. Além disso, isolamos e caracterizamos as VEs liberadas após as interações. Os resultados demonstraram que a infecção por *G. intestinalis* induziu um aumento expressivo na liberação de VEs pelas células epiteliais, um efeito também observado

na condição em que o parasita e suas vesículas foram adicionados simultaneamente (Figura 40B). Além do aumento na quantidade, as VEs liberadas nessas condições apresentaram um tamanho médio maior em comparação às células não tratadas (Figura 40C). Possivelmente uma resposta ao efeito de estresse ou vias de sinalização induzidas pelo parasito.

Figura 40 – Efeito da infecção por *G. intestinalis* e de suas vesículas extracelulares (gEVs) na permeabilidade epitelial e na liberação de vesículas pelas células Caco-2

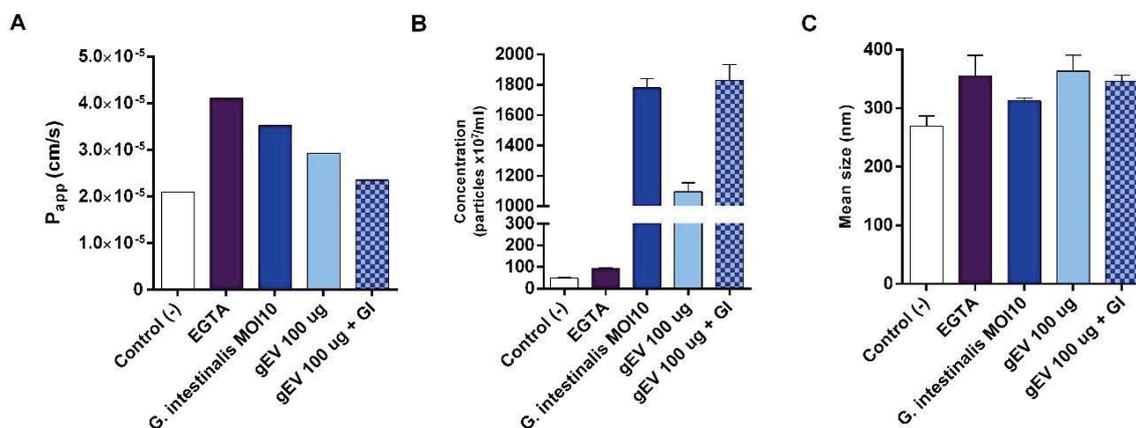


A) Permeabilidade aparente (P<sub>app</sub>) das células Caco-2 após 10 dias de diferenciação, tratadas com *G. intestinalis* (MOI 10), gEVs ou a combinação de ambos. B) Concentração de vesículas extracelulares liberadas após as diferentes interações. C) Tamanho médio das vesículas extracelulares analisadas por NTA.

Diferentemente células Caco-2 cultivadas individualmente, a co-cultura de células Caco-2 e HT-29 apresentou um aumento na permeabilidade epitelial em todas as condições testadas, incluindo a infecção por *G. intestinalis*, o tratamento com gEVs e a combinação de ambos (Figura 41A). Esse achado sugere um possível efeito sinérgico entre o parasita e suas VEs na desestabilização da barreira epitelial quando ambas as linhagens celulares estão presentes, possivelmente devido a alterações na composição da matriz extracelular ou na dinâmica das junções intercelulares.

Essas mesmas condições resultaram em um aumento liberação de VEs (Figura 41B), indicando que a co-cultura pode amplificar a resposta celular à infecção e ao estímulo por gEVs. Notavelmente, o tamanho médio das vesículas liberadas também foi maior, acima de 350 nm (Figura 41C), reforçando a hipótese de que a interação entre diferentes tipos celulares pode influenciar não apenas a quantidade, mas também as características estruturais das VEs.

Figura 41 – Efeito da infecção por *G. intestinalis* e de suas vesículas extracelulares (gEVs) na permeabilidade epitelial e na liberação de vesículas em co-cultura de Caco-2 e HT-29



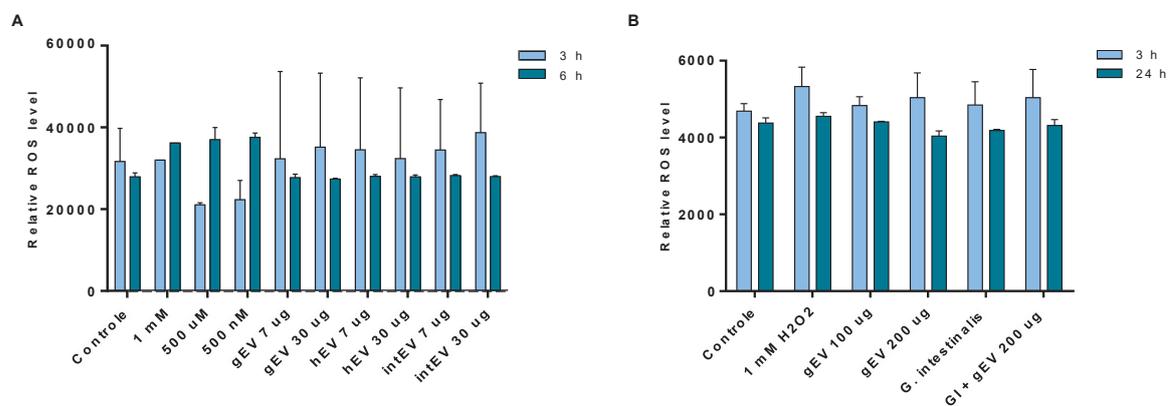
A) Permeabilidade aparente (P<sub>app</sub>) da co-cultura de células Caco-2 e HT-29 após 10 dias de diferenciação, tratadas com *G. intestinalis* (MOI 10), gEVs ou a combinação de ambos. B) Concentração de vesículas extracelulares liberadas após as diferentes interações. C) Tamanho médio das vesículas extracelulares analisadas por NTA.

#### 4.6 EFEITO DAS VESÍCULAS NA INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS CACO-2

Para compreender o impacto fenotípico das VEs nas células epiteliais intestinais, avaliamos a resposta dessas células a espécies reativas de oxigênio (ROS), em diferentes condições após a exposição às VEs. O estresse oxidativo é um fator crítico na homeostase celular e pode influenciar a integridade da barreira epitelial, a ativação de vias de sinalização e a resposta inflamatória.

Inicialmente, testamos as concentrações 7 e 30 µg de gEV, hEV e intEV por 3 e 6 h na resposta ao estresse oxidativo. Nós observamos que após esse período não houve alterações significativas, no entanto observamos uma oscilação elevada, o que poderia indicar um efeito (Figura 42A). Diante disso, realizamos um novo experimento avaliando concentrações mais elevadas (100 e 200 µg) de gEV e incluindo *G. intestinalis* isoladamente e em combinação com gEV, com tempos de incubação de 3 e 24 h. Os resultados mostraram um padrão variável em 3 h, sugerindo uma possível resposta inicial, mas sem aumento expressivo dos níveis de ROS ao longo de 24 h (Figura 42B). Esses achados indicam que, nas condições testadas, as VEs e *G. intestinalis* não induzem estresse oxidativo significativo nas células Caco-2.

Figura 42 – Níveis relativos de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células Caco-2 após incubação com diferentes vesículas extracelulares (gEV, hEV, intEV) e *G. intestinalis*



A) Avaliação inicial com baixas concentrações (7 e 30  $\mu$ g) por 3 e 6 h. (B) Análise com concentrações mais elevadas (100 e 200  $\mu$ g) de gEV e *G. intestinalis* isoladamente ou em combinação, por 3 e 24 h. Os dados representam a média  $\pm$  DP.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 DIFERENTES TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES SÃO PRODUZIDOS DURANTE A INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA

A liberação de VEs por protozoários parasitas já foi demonstrada em diversas espécies, incluindo *T. vaginalis* (Twu et al., 2013), *Leishmania spp* (Silverman et al., 2008; Zauli et al., 2023), *T. gondii* (Li et al., 2018; Gómez-Chávez et al., 2023), *T. cruzi* (Cestari et al., 2012) e *Plasmodium* (Tandoh et al., 2021; Khowawisetsut et al., 2023), entre outros. No caso de *Giardia*, nossos achados indicam que as VEs geradas durante a interação parasita-célula hospedeira apresentam um tamanho médio de 150-300 nm, consistente com pesquisas anteriores (Gavinho et al., 2020). Determinar até que ponto as membranas do parasita ou das células hospedeiras contribuem para a formação dessas vesículas de interação é um desafio. No entanto, um estudo de Ramirez et al. (2017) revelou que VEs derivadas da interação entre formas metacíclicas de *T. cruzi* e células THP-1 contêm proteínas tanto do patógeno quanto do hospedeiro, sugerindo através de experimentos de FRET, um possível processo de fusão de membranas durante a liberação das VEs. Entender se essas vesículas mistas desempenham um papel diferencial durante a interação parasita-célula hospedeira é de particular interesse, especialmente porque poucos estudos exploraram as diferenças na origem das VEs (Mantel & Marti, 2014).

Nós temos proposto que vesículas de interação (intEVs) sugerem um papel mais amplo para as VEs além da comunicação tradicional: elas representam um mecanismo de fusão de membranas que permite aos patógenos se apropriarem dos recursos do hospedeiro de maneiras que podem remodelar a dinâmica hospedeiro-patógeno, aprimorar a virulência ou modulação imune. Essas vesículas híbridas são caracterizadas por suas membranas de origem dual, contendo uma mistura de proteínas, lipídios e outros componentes moleculares derivados tanto do hospedeiro quanto do patógeno. Essa composição única permite que as vesículas de interação atuem como plataformas especializadas para a troca de sinais moleculares, facilitando a evasão imune, potencializando a virulência do patógeno e modificando o ambiente celular do hospedeiro para favorecer uma infecção persistente. Nossa hipótese é que as intEVs desempenham um papel duplo na interação patógeno-hospedeiro, podendo tanto favorecer a infecção quanto desencadear respostas imunes. Elas transportam PAMPs que ativam a imunidade inata, induzindo a produção de citocinas e a apresentação de antígenos, o que pode contribuir para a eliminação do patógeno

(Chen et al., 2020; Wang et al., 2020). No entanto, são necessárias mais evidências para esclarecer seu papel na nesta interação entre patógeno e hospedeiro.

## 5.2 A LIBERAÇÃO DE LEVS DE *G. INTESTINALIS* E DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS É DEPENDENTE DE CÁLCIO

Já foi descrito que a liberação de exossomos dependente de formação de corpúsculos multivesiculares e do completo ESCRT não é dependente de cálcio. Em contraste com os exossomos, as microvesículas (MVs) não são formadas na via endocítica. Elas se formam a partir do brotamento da membrana plasmática, em um mecanismo dependente de cálcio. A liberação das MVs ocorre através de estímulos externos, ativadores ou algum tipo de dano celular que aumentam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma ou sua liberação do fontes internas. O aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  ( $\text{Ca}^{2+}$  intracelular concentração) é seguido por clivagem mediada por calpaína da actina constituída no citoesqueleto. Nesta condição, a scramblase é ativado e transporta os fosfolipídios carregados negativamente da membrana interna para o externo da membrana plasmática, resultando na formação de microvesículas com fosfatidilserina exposta na superfície (Akers et al. 2013). Os nossos dados sugerem a dependência de cálcio para formação de microvesículas ou LEVs tanto nos parasitas quanto em células hospedeiras. Observamos que células tratadas com EGTA (quelante de cálcio) e células inativadas com PFA inibem a liberação de VEs maiores (LEVs) durante a primeira hora de tratamento, pois observamos VEs de tamanho médio inferiores a 200 nm, sugerindo a importância do cálcio para liberação de LEVs (Fig. 7).

## 5.3 DINÂMICA DO “UPTAKE” DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DURANTE A INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA

Compreender os mecanismos pelos quais as VEs são internalizadas por células hospedeiras é crucial para desvendar os processos de infecção e patogênese estabelecidos por *G. intestinalis*. Nossos achados indicam que a internalização das VEs ocorre predominantemente via endocitose, consistente com estudos prévios (Mulcahy et al., 2014). A redução significativa do “uptake” de VEs a 4°C, que observamos, reforça a ideia de que esse processo é dependente de energia, corroborando estudos que mostram tendência semelhante (Jurgielewicz et al., 2020; Svensson et al., 2013; Roerig et al., 2021), indicando que o processo pode ser parcialmente ou completamente inativado.

Nossos resultados de citometria de fluxo revelam padrões distintos de internalização para os três tipos de VEs, com as intEV sendo internalizadas mais rapidamente do que os outros dois tipos de VEs nas primeiras seis h. Essa rápida internalização sugere que as intEV possuem componentes de superfície ou moléculas de sinalização específicas que facilitam seu reconhecimento e interação com as células Caco-2, o que requer mais investigação (Nanbo et al., 2013; Schorey & Harding, 2016). Esse achado está alinhado com pesquisas anteriores indicando que o “uptake” de VEs é influenciada pelo tempo e pela dose, como também observamos em nossos experimentos (de la Torre-Escuredo et al., 2019; Mbagwu et al., 2019; Svensson et al., 2013).

Os dados de citometria podem ser complementados pelas análises de microscopia confocal, que fornecem evidências cruciais sobre a dinâmica da internalização dos diferentes tipos de VEs. Ao contrário da citometria, que oferece uma análise quantitativa, a microscopia confocal permite uma visualização tridimensional e espacial, confirmando com maior precisão a internalização das vesículas dentro das células hospedeiras. O “uptake” uniforme observado na primeira hora, seguido de um aumento notável do “uptake” de intEV após três h, destaca as interações complexas entre essas vesículas e as células hospedeiras. Os perfis distintos de internalização das gEVs, hEVs e intEVs sugerem que cada tipo pode utilizar mecanismos específicos para o “uptake”. Por exemplo, células NK e linhagens epiteliais exibem preferências distintas na internalização de exossomos: células NK possuem maior capacidade de internalizar exossomos originados delas mesmas e de células derivadas da medula óssea, enquanto células epiteliais absorvem preferencialmente exossomos derivados de outras células epiteliais (Huyan et al., 2018).

#### 5.4 A PARTICIPAÇÃO DAS VES NA COMUNICAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA DEPENDE DE ENDOCITOSE E PODE SER BLOQUEADA POR INIBIDORES

Para investigar as vias envolvidas na internalização de VEs, utilizamos inibidores específicos direcionados à diferentes tipos de endocitose. Nossos resultados indicaram que os mecanismos mediados por clatrina, dinamina e macropinocitose são essenciais para esse processo, corroborando estudos anteriores que destacam essas vias endocíticas como fundamentais para o “uptake” de VEs

(Mulcahy et al., 2014). Esses achados ressaltam a importância dessas vias na comunicação celular e na interação patógeno-hospedeiro (Rai & Johnson, 2019; Bajic et al., 2020).

Nossos dados sugerem fortemente que a internalização das gEVs ocorre por uma via dependente de clatrina e dinamina, independentemente de caveolas e balsas lipídicas, mas modulada pela atividade de tirosina quinase a qual deve estar associada a clatrina e receptores, assim como macropinocitose. Essa conclusão é sustentada pela inibição substancial do “uptake” de VEs pelo Dynasore, um inibidor de dinamina, que reduziu a internalização de gEV, hEV e intEV em aproximadamente 90%. O Dynasore atua como um inibidor de GTPase, bloqueando rápida e reversivelmente a atividade da dinamina, impedindo assim a endocitose. Essa observação está em concordância com estudos anteriores. Por exemplo, Guidi et al. (2013) demonstrou que o Dynasore reduziu significativamente a internalização de vesículas da membrana externa (OMVs) de bactérias e o subsequente dano ao DNA causado por toxinas, sugerindo o envolvimento da endocitose dependente de dinamina na captação de OMVs carregadas com toxina tifoide. Da mesma forma, Toribio et al. (2019) relatou uma redução significativa na internalização de VEs após tratamento com Dynasore, inibindo até 80% da captação de OMVs de *Bacillus thuringiensis* por células epiteliais intestinais. Esses estudos destacam o potencial de se direcionar vias dependentes de dinamina para interromper interações parasita-hospedeiro e inibir a comunicação patogênica mediada por VEs. Além disso, Joshi et al. (2020) demonstraram que células neuronais internalizam VEs por uma via dependente de dinamina, com o tratamento com Dynasore levando a uma redução significativa na captação. Nossos achados reforçam ainda mais o papel essencial da dinamina na internalização de vesículas derivadas do parasita e na interação parasita-hospedeiro.

Para elucidar melhor os mecanismos endocíticos envolvidos na internalização de VEs por células Caco-2, utilizamos microscopia confocal, que permitiu a visualização em alta resolução do processo de internalização das VEs. Essa abordagem forneceu evidências sobre vias endocíticas específicas e possibilitou a localização precisa das VEs no ambiente celular (Nanbo et al., 2013; Mulcahy et al., 2014).

O envolvimento das vias mediadas por clatrina e caveolina na endocitose de VEs tem sido destacado em diversos estudos. Rai e Johnson (2019) demonstraram que a internalização de VEs de *T. vaginalis* é dependente de caveolina e regulada

pela caveolina-1 da célula hospedeira. De maneira semelhante, Bajic et al. (2020) mostrou que VEs de *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 são internalizadas por células HT-29 por meio da endocitose mediada por clatrina (CME), sem a necessidade de balsas lipídicas enriquecidas com colesterol. O papel da CME na captação de VEs foi ainda reforçado pelo uso de inibidores, como clorpromazina e Dynasore.

Para refinar nossa compreensão sobre esses mecanismos de “uptake”, utilizamos inibidores específicos de endocitose. Genisteína (inibidor de tirosina quinase) e MDC (inibidor da endocitose mediada por clatrina) reduziram significativamente a captação de intEV e gEV, embora com sensibilidades diferentes. O “uptake” de gEVs foi mais afetado pela Genisteína, sugerindo uma maior dependência da atividade de tirosina quinase, enquanto intEVs foram mais inibidas pelo MDC, confirmando uma via dependente de clatrina. Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores que demonstram o “uptake” de VEs mediada por clatrina em outros modelos. Escrevente et al. (2011) demonstraram que exossomos de câncer de ovário são internalizados via CME, com a supressão da clatrina ou a inibição farmacológica bloqueando significativamente sua captação.

Notavelmente, a combinação de genisteína e MDC produziu um efeito sinérgico, reforçando ainda mais o envolvimento da dinamina em ambas as vias e sugerindo uma possível interação entre a endocitose mediada por clatrina e por caveolina. No entanto, o tratamento com M $\beta$ CD, que desestabiliza balsas lipídicas e inibe vias mediadas por caveolas, não reduziu significativamente a captação de nenhum tipo de VE, sugerindo que caveolas não estão envolvidas na internalização de gEVs. Além disso, a sinalização por tirosina quinase parece modular essas vias, uma vez que a genisteína sozinha reduziu significativamente a captação de gEVs, em conformidade com os achados de Sorkin e Goh (2008), que demonstraram que a atividade de tirosina quinase regula a CME durante a internalização de receptores. Isso sugere que a sinalização de tirosina quinase pode influenciar a eficiência da captação de VEs e, conseqüentemente, impactar a comunicação parasita-hospedeiro.

Além disso, utilizando EIPA (um inibidor do trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), confirmamos um papel crucial da macropinocitose na entrada das VEs, evidenciado por um alto nível de inibição (acima de 90%) em todos os tipos de VEs analisadas (gEV, hEV e intEV). Isso sugere que a macropinocitose, influenciada pelo intercâmbio iônico e pela acidificação intracelular, é uma via crítica para a captação de VEs, independentemente da origem das vesículas. Costa Verdera et al. (2017) propôs que

a internalização de VEs ocorre principalmente por endocitose independente de clatrina e por macropinocitose, sendo essa última dependente de colesterol, tirosina quinase, troca de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e atividade da fosfoinositídeo 3-quinase, essenciais para a macropinocitose. Pavkova et al. (2021) investigaram o papel das vesículas de membrana externa (OMVs) da bactéria *Francisella tularensis* na interação inicial com macrófagos. Os resultados demonstraram que as OMVs foram rapidamente internalizadas pelos macrófagos, sendo primeiramente detectadas em compartimentos semelhantes a endossomos tardios. A internalização ocorreu predominantemente por macropinocitose, evidenciada pelo uso do inibidor amiloride, e por endocitose mediada por clatrina, confirmada pela inibição com dansilcadaverina. Além disso, os autores sugerem que a endocitose mediada por *lipid rafts* pode ter uma participação menor no processo de internalização dessas OMVs.

Por fim, o tratamento com Bafilomicina A1, um inibidor da H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar, inibiu a captação de intEVs em ~90%, com um efeito moderado sobre as gEVs. Isso sugere que as intEVs dependem de vias sensíveis ao pH, como os endossomos acidificados e poderiam desta maneira estar liberando o cargo. Essa adaptação permitiria que as intEVs explorem mecanismos regulados pelo pH para facilitar sua internalização, representando potencialmente uma estratégia evolutiva dos parasitas.

Ao realizar o experimento de proliferação celular (Figura 14) observamos que as intEVs podem influenciar o crescimento das células epiteliais intestinais, possivelmente por meio de seu “uptake” e da entrega de biomoléculas que modulam vias associadas à renovação celular. Esse efeito pode estar relacionado à regulação da integridade da barreira intestinal, influenciando tanto a taxa de proliferação celular quanto a resposta da célula hospedeira às condições do microambiente.

## 5.5 A PARTICIPAÇÃO DAS VES NA COMUNICAÇÃO PARASITA-CÉLULA

A comunicação entre parasitas pode desempenhar um papel fundamental na regulação de sua biologia e interação com o hospedeiro. Nossos dados indicam que *G. intestinalis* responde ao estímulo de VEs exógenas, em gEV e intEVs, com um aumento na liberação de VEs, especialmente em resposta a intEV. No entanto, a resposta do parasita às VEs exógenas foi transitória, com a liberação de VEs voltando aos níveis basais após 30 min de exposição, indicando uma adaptação temporária do parasita ao estímulo. Essa resposta é interessante, pois sugere que o processo de comunicação entre parasitas é dinâmico e temporal, possivelmente para evitar uma

sobrecarga de estímulos ou para comunicar-se em situação emergencial até conseguir adaptar-se ou neutralizar o estímulo.

No estudo realizado por Salas et al. (2023), foi demonstrado que a interação entre diferentes cepas de *T. vaginalis* influencia diretamente a adesão do parasita às células BPH-1, um processo essencial para o estabelecimento da infecção. Notavelmente, a cepa mais aderente (CDC1132) aumentou a adesão da cepa menos aderente (G3) às células hospedeiras, sugerindo um mecanismo de comunicação parasita-parasita que modula a virulência. Além disso, essa interação induziu a formação de citonemas e filopódios, estruturas associadas à mediação de contatos célula-célula e à facilitação da adesão. Paralelamente, foi observado um aumento na conversão morfológica para a forma ameboide, indicando que fatores liberados, entre eles as VEs de diferentes cepas, podem atuar como mediadores dessa comunicação, modulando o comportamento do parasita receptor.

Outro estudo publicado por Szempruch et al. (2016), demonstrou que *Trypanosoma brucei rhodesiense* libera VEs contendo o fator de resistência ao fator lítico tripanossômico (TLF), conhecido como SRA. Os autores investigaram se a transferência de SRA para *T. b. brucei* selvagem poderia conferir resistência ao TLF. Para isso, utilizaram abordagens de co-incubação, nas quais *T. b. brucei* selvagem foi exposto a *T. b. brucei* SRA-Ty (uma cepa de *T. b. brucei* que expressa SRA marcado com o epítipo Ty) ou de *T. b. rhodesiense*. Além disso, os autores empregaram VEs purificadas para evitar que moléculas solúveis pudessem contribuir para a transferência da resistência. Os resultados mostraram que a transferência de SRA pelas VEs levou a um aumento significativo na sobrevivência dos parasitas selvagens na presença de TLF, corroborando o papel das VEs na disseminação da resistência entre as espécies de *T. brucei*.

Em relação ao “uptake” das VEs, nossos experimentos com *G. intestinalis* revelaram que o parasita é capaz de internalizar tanto VEs presentes no secretoma quanto VEs previamente isoladas. Corroborando com nossos resultados, Natali et al. (2023) demonstraram, por meio de experimentos de marcação com SYTO® RNASelect™, que os sRNAs presentes nas VEs foram rapidamente internalizados pelos trofozoítos de *Giardia*. Após apenas 5 min de incubação, os sRNAs marcados foram detectados em vacúolos periféricos abaixo da membrana plasmática, evidenciando uma internalização eficiente. Após 1 hora, esses sRNAs estavam distribuídos pelo citoplasma dos trofozoítos, sugerindo um possível papel na

comunicação entre os parasitas. Demonstramos que a internalização de VEs foi bloqueada pelo Dynasore, um inibidor de dinamina, sugerindo que é um processo dinamina dependente. Além disso, nossos resultados indicam que a internalização de VEs tem um impacto na adesão do parasita às células hospedeiras. Quando a internalização de VEs foi bloqueada, houve uma redução na adesão de *G. intestinalis* às células hospedeiras, o que reforça a ideia de que as VEs desempenham um papel fundamental na modulação da adesão e na comunicação celular entre parasitas. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Gavinho et al. (2020), que demonstrou que a inibição da liberação de VEs de *G. intestinalis* por meio de um inibidor de peptidilarginina deiminase (PAD) resultou em uma redução significativa na adesão dos trofozoítos às células Caco-2. No entanto, as LEVs foram capazes de restaurar a adesão do parasita, evidenciando o papel específico dessas vesículas e não de SEVs na interação parasita-hospedeiro.

A diferença que observamos no “uptake” de VEs pelo parasito, indica que poderia haver componentes diferentes presentes nas VEs que estariam facilitando ou inibindo o “uptake” de VEs.

## 5.6 ANÁLISE LIPÍDICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

A caracterização das VEs tem impulsionado investigações em diversas áreas da biologia celular, abrangendo abordagens ômicas como transcriptômica, proteômica e lipidômica (Choi et al., 2013). Dentre essas, a lipidômica tem se mostrado essencial para compreender a composição e as funções dessas vesículas, uma vez que os lipídios desempenham papéis fundamentais na estrutura, na comunicação celular e na regulação de processos biológicos (Grajeda et al., 2022; Faria et al., 2023).

Neste estudo, buscamos entender como *G. intestinalis* influencia a composição lipídica das VEs durante a interação com células Caco-2. Para isso, utilizamos [<sup>3</sup>H]-palmitato para rastrear a incorporação de lipídios nas VEs ao longo de 1h e 24h de interação. As principais classes lipídicas envolvidas nesse enriquecimento foram fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e ácido fosfatídico (PA). Já nas SEVs, observamos uma dinâmica diferente: enquanto o PG apresentou um aumento expressivo já na primeira hora de interação, após 24 h houve uma redistribuição dos lipídios, com redução nas quantidades de PA e PE. Isso sugere que, ao longo do tempo, as SEVs passam por uma reorganização estrutural, possivelmente refletindo mudanças

funcionais no contexto da interação parasita-hospedeiro. Esses achados indicam que a interação com *G. intestinalis* promove uma modulação dinâmica da composição lipídica das VEs, de forma distinta entre LEVs e SEVs. As LEVs parecem sofrer um enriquecimento progressivo de lipídios ao longo da infecção, sugerindo um papel mais associado à modulação da resposta inflamatória do hospedeiro. Em contrapartida, a redistribuição lipídica observada nas SEVs pode estar relacionada a processos de sinalização celular, reforçando a ideia de que diferentes populações de vesículas podem exercer funções complementares durante a infecção.

Ao analisarmos o perfil de ácidos graxos das VEs isoladas, encontramos diferenças marcantes entre as subpopulações. Nas LEVs coletadas após 1h de interação, as gEVs apresentaram uma maior abundância de ácidos graxos saturados, como ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0) e, especialmente, ácido palmítico (C16:0). Em contrapartida, as hEVs e intEVs exibiram um perfil lipídico mais diversificado, com aumento da concentração de ácidos graxos insaturados, como ácido oleico (C18:1n9c) e ácido linoleico (C18:2n6c), especialmente nas intEVs. Após 24h de interação, as gEVs mantiveram altos níveis de ácido palmítico (C16:0), enquanto as hEVs e intEVs passaram por ajustes na composição lipídica, com aumento dos níveis de ácidos graxos insaturados e de cadeia longa, como ácido docosenoico (C22:1n13). O aumento de ácidos graxos insaturados nas intEVs pode ser uma resposta adaptativa à interação parasita-hospedeiro, possivelmente facilitando alterações na fluidez da membrana e na comunicação celular.

Nossos resultados se alinham aos achados de Faria et al. (2023), que analisaram o lipidoma das VEs de *Giardia* e do trofozoíto por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O estudo identificou 162 espécies lipídicas distribuídas em diversas classes, incluindo PC, PE, PG, PI, esfingomielina (SM), ceramidas, colesterol e cardiolipinas (CL), além de subclasses como LPC, LPE e LPG. A semelhança entre os perfis lipídicos descritos nesse estudo e os observados em nossas análises reforça que os lipídios desempenham um papel essencial na biologia das VEs e podem refletir adaptações do parasito ao ambiente hospedeiro.

Essa plasticidade lipídica das VEs também foi observada no estudo de Yichoy et al. (2009), que demonstrou que *Giardia* modula sua composição lipídica em resposta ao ambiente hospedeiro. Os autores identificaram que os fosfolipídios PG e PE são gerados por remodelação lipídica, sendo o PG um lipídio recém-sintetizado pelo parasito. Nossos dados sugerem que um processo semelhante ocorre em *G.*

*intestinalis*, onde a modulação lipídica das VEs pode envolver tanto a troca de grupos cabeça quanto a remodelação de ácidos graxos.

Além disso, enquanto Yichoy et al. (2009) relataram que os lipídios de *Giardia* são majoritariamente adquiridos de fontes externas, como bile e soro, nossos dados sugerem que a interação parasita-hospedeiro pode induzir modificações específicas na composição lipídica das VEs. O aumento de ácidos graxos insaturados nas intEVs pode refletir uma adaptação ao ambiente imunológico do hospedeiro e um mecanismo para facilitar a comunicação celular.

Esses resultados são consistentes com estudos em outros protozoários, como *Leishmania spp.*, cujas VEs demonstraram uma alta composição de esfingolipídios e glicosilfosfatidilinositol (GPI), moléculas que auxiliam na evasão do sistema imune e na modulação das células hospedeiras (Silverman et al., 2010). Além disso, as VEs de *Trypanosoma cruzi* também exibem altos níveis de fosfatidilserina, lipídio que favorece a adesão e a internalização em células hospedeiras (Bayer-Santos et al., 2013). Em helmintos, como *Fasciola hepatica*, as vesículas possuem uma alta concentração de lipídios bioativos, como ácidos graxos livres e derivados de prostaglandinas, que modulam as respostas inflamatórias do hospedeiro (de la Torre-Escudero et al., 2019). Diferentemente, as VEs de *G. intestinalis* demonstraram uma maior prevalência de lipídios estruturais, o que pode refletir a necessidade deste parasita em manter a integridade das vesículas para sobrevivência no ambiente intestinal hostil.

Em relação aos fungos, como *Cryptococcus neoformans*, suas VEs são caracterizadas por lipídios que facilitam a evasão imune, como o glucuronoxilomanano (GXM) (Rodrigues et al., 2008). Embora *G. intestinalis* não produza esse tipo de componente, a alta concentração de lipídios de membrana sugere um mecanismo adaptativo semelhante para proteção contra o reconhecimento imune.

As VEs derivadas de células hospedeiras (hEVs) mostraram uma composição lipídica enriquecida em fosfolipídios associados à sinalização celular, como fosfatidilinositol e fosfatidilserina. Essas moléculas estão envolvidas na modulação de processos celulares, como apoptose e ativação imune, o que sugere que as hEVs podem ser cruciais na resposta inicial ao parasita.

A presença de lipídios específicos nas gEVs pode ser um fator determinante para sua interação com as células hospedeiras. Lipídios como a esfingomiélnina e o colesterol podem facilitar a fusão das vesículas com a membrana celular, promovendo

a transferência de fatores de virulência. Essa estratégia é semelhante à observada em outros parasitas, como *Leishmania* e *T. cruzi*, onde os lipídios das VEs são determinantes para a modulação das respostas imunológicas do hospedeiro (Hassani & Olivier, 2013; Ramirez et al., 2017). Os resultados também indicam que o conteúdo lipídico das VEs influencia diretamente os mecanismos de “uptake”, com intEVs sendo mais rapidamente internalizadas, possivelmente devido a uma composição lipídica mais favorável à fusão com a membrana plasmática

## 5.7 ANÁLISE PROTEICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Entre as abordagens ômicas, a proteômica tem sido a mais amplamente explorada, com diversos estudos sobre VEs de eucariotos superiores, protozoários, bactérias e plantas (Lin et al., 2019; Bertolone et al., 2023; Shlomovitz et al., 2021).

Os resultados proteômicos revelaram que durante a interação a dinâmica da infecção poderia estimular diferenças na participação das proteínas do patógeno ou do hospedeiro a serem envolvidas na origem das vesículas de interação liberadas durante o processo de interação. Sendo as gEVs enriquecidas com proteínas associadas à adesão, virulência e modulação imune, incluindo proteínas de superfície como VSPs (Variant-Specific Surface Proteins), enolase, actina e peptidases. A presença dessas proteínas destaca a capacidade adaptativa das gEVs na interação com o hospedeiro, favorecendo a adesão às células intestinais e contribuindo para a modulação do ambiente imune.

Essa composição proteômica é semelhante a outros parasitas protozoários. Por exemplo, em *Leishmania spp.*, as VEs contêm a metaloprotease GP63, conhecida por degradar proteínas do sistema imune e inibir a ativação de macrófagos (Silverman et al., 2010). Em *Trypanosoma cruzi*, as VEs apresentam trans-sialidases e cruzipainas, que favorecem a invasão celular e modulam a resposta imune do hospedeiro (Bayer-Santos et al., 2013). Comparando com helmintos, como *Fasciola hepatica*, as VEs são enriquecidas em proteínas excretoras/secretoras, incluindo enolase, GAPDH e leucina aminopeptidase, que modulam a resposta imune ao interagir com macrófagos e facilitar a evasão imune (de la Torre-Escudero et al., 2019). A presença de enolase nas gEVs sugere uma função semelhante na adesão às células hospedeiras e na facilitação do metabolismo do parasita durante a infecção.

Nos fungos patogênicos, como *Candida albicans*, as VEs apresentam proteínas relacionadas à formação de biofilme e resistência a estresses ambientais, como HSPs

(Heat Shock Proteins) e proteínas de parede celular (Zamith-Miranda et al., 2021). Embora o papel de formação de biofilme não seja diretamente aplicável a *G. intestinalis*, o enriquecimento de proteínas de adesão nas gEVs sugere uma estratégia adaptativa semelhante para facilitar a fixação ao epitélio intestinal.

As hEVs apresentaram uma composição proteômica mais típica de células eucarióticas, com enriquecimento em proteínas associadas à manutenção da integridade da membrana, sinalização celular e remodelamento citosquelético, como integrinas, tetraspaninas e actina. A presença dessas proteínas sugere que as hEVs desempenham um papel importante na modulação das interações celulares, sendo potencialmente captadas por células adjacentes para mediar respostas imunes ou reparo tecidual. Além disso, proteínas associadas ao transporte de lipídios e modulação do citoesqueleto foram abundantes nas hEVs, indicando um possível papel na manutenção da homeostase epitelial, o que poderia ser fundamental para contrabalançar os efeitos patogênicos promovidos pelas gEVs.

As intEVs, formadas durante a interação entre *G. intestinalis* e células Caco-2, apresentaram um perfil proteômico híbrido, contendo proteínas de origem parasitária (como VSPs e enolase) e proteínas do hospedeiro (como integrinas e tetraspaninas). Essa mistura de proteínas sugere que as intEVs podem desempenhar um papel mais complexo na modulação da interação parasita-hospedeiro. Podendo favorecer uma maior eficiência no “uptake” dessas vesículas pelas células hospedeiras, como evidenciado nos experimentos de internalização. Além disso, a presença de proteínas associadas à resposta imune sugere que as intEVs podem modular o ambiente celular, potencialmente inibindo a ativação de respostas inflamatórias para favorecer a persistência do parasita.

O estudo de Rossi et al. (2024) analisou a interação de *Trypanosoma cruzi* com células Caco-2 e C2C12 nos tempos de 2 h e 24 h, demonstrando que a composição proteica das VEs sofre modificações ao longo da infecção. Nos estágios iniciais (2 h), as VEs continham proteínas associadas à resposta imediata do hospedeiro, incluindo proteínas de adesão celular e do citoesqueleto, sugerindo uma tentativa inicial da célula de reconhecer e responder ao parasita. Já em 24 h, observou-se um enriquecimento de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, translocação citoplasmática e modulação da resposta imune, refletindo uma adaptação mais estruturada ao processo infeccioso. Além disso, mostraram que a composição proteica das VEs varia não apenas com o tempo, mas também entre as diferentes

populações de vesículas, com perfis distintos entre as VEs derivadas exclusivamente do parasita e aquelas oriundas da interação com a célula hospedeira. De maneira semelhante, nossos resultados indicam que ao longo do tempo, as intEVs adquirem um conteúdo proteico mais complexo, possivelmente favorecendo a evasão imune e a persistência da infecção.

Esses achados contribuem para o entendimento da complexidade das interações durante a infecção por *G. intestinalis* e destacam a importância das VEs como potenciais alvos terapêuticos para futuras estratégias de controle da giardíase.

## 5.8 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NA INTEGRIDADE DA BARREIRA INTESTINAL EM MODELOS 3D

Modelos tridimensionais (3D) têm se mostrado uma ferramenta essencial para a investigação de mecanismos fisiológicos, oferecendo uma representação mais precisa da complexidade das interações celulares *in vivo* em comparação com os tradicionais modelos bidimensionais (Paradiso et al., 2021; Habanjar et al., 2021). No contexto da barreira intestinal, esses modelos são especialmente relevantes, pois permitem a simulação das interações entre células epiteliais, a matriz extracelular e outros tipos celulares, o que não é possível em modelos monocamada simples (Kus, Ibragimow & Piotrowska-Kempisty, 2023; Macedo et al., 2020). Além disso, os modelos 3D permitem evitar a experimentação animal, sendo uma alternativa importante frente a um apelo mundial de diminuição de uso de animais para pesquisa.

No presente estudo, buscamos avaliar o papel das gEVs na integridade da barreira intestinal, dado que trabalhos anteriores, como o de Holthaus et al. (2022), já haviam descrito a indução da quebra da barreira intestinal por *G. intestinalis* em modelos de organoides humanos derivados de epitélio intestinal. No estudo citado, os autores demonstraram que a infecção por *G. intestinalis* resultou em uma diminuição da resistência da barreira intestinal, avaliado por TEER, com alterações das proteínas do hospedeiro, associadas as tight junctions, levando ao aumento da permeabilidade e comprometendo a função de barreira do epitélio intestinal.

Diferentemente, o estudo de Kraft et al. (2017) comparou diversos estudos da literatura que demonstram a quebra da barreira epitelial induzida por *G. intestinalis*. No entanto, os resultados desse estudo indicam que a infecção por *G. intestinalis* no modelo de células Caco-2 não causa defeitos agudos na barreira epitelial, nem altera significativamente a estrutura das tight junctions ou a permeabilidade celular. Os

autores destacam que a padronização experimental é fundamental para obter resultados consistentes. Eles observam que variações no desenho experimental, como o tempo de diferenciação celular, a composição do meio de cultura, o MOI e a presença de Soro Fetal Bovino (SFB), podem influenciar de maneira significativa os resultados, ajudando a explicar as discrepâncias observadas entre os estudos sobre o impacto de *Giardia* na barreira epitelial. Por essas razões, a utilização de modelos de co-cultura é essencial, pois mimetiza as interações celulares no contexto fisiológico, contribuindo para resultados mais precisos na avaliação dos mecanismos que regulam a integridade da barreira epitelial.

Considerando que as VEs são extensões da célula de origem e carregam diferentes biomoléculas, nós decidimos investigar se os efeitos observados com a infecção por *G. intestinalis* seriam reproduzidos pela exposição das células Caco-2 às VEs do parasita. A hipótese era que, assim como o parasita, as VEs poderiam induzir a quebra da barreira epitelial, afetando as tight junctions e aumentando a permeabilidade da barreira intestinal. Portanto, utilizamos um modelo 3D de células Caco-2 para investigar nossa hipótese. Essa abordagem permitiu observar de forma mais fisiológica a resposta das células à exposição as VEs, com um foco específico na permeabilidade e expressão de proteínas essenciais na formação das junções intercelulares/tight junctions, como ZO-1. Embora o modelo 3D tenha sido essencial para fornecer uma visão mais realista das interações parasita-hospedeiro, os resultados obtidos revelaram que o TEER e o coeficiente de permeabilidade aparente (Papp) não apresentaram alterações significativas, sugerindo que o modelo monocamada de Caco-2 isolado pode não ser suficientemente sensível para detectar modificações sutis na integridade da barreira intestinal em resposta às VEs de *G. intestinalis*.

De acordo com Kus et al. (2023), é possível obter um modelo de células Caco-2 diferenciadas que simula de forma eficaz a barreira intestinal humana, porém, isso exige um alto padrão de padronização. Entre os principais critérios de padronização estão a diferenciação das células ao longo de 21 dias para a formação das tight junctions e a utilização da resistência transepitelial (TEER) como indicador da integridade da barreira. A formação do epitélio diferenciado é considerada adequada quando os valores de TEER variam entre  $\sim 160 \Omega\text{cm}^2$  e  $1000 \Omega\text{cm}^2$ . Além disso, o modelo deve apresentar alta permeabilidade celular, sendo testado com controles positivos e negativos de permeabilidade. A padronização também envolve o controle

rigoroso das condições de cultivo, incluindo o tipo de meio, temperatura e pH. Os nossos resultados de TEER variaram entre 200 e 380 ohms, o que indica uma possível formação do epitélio, embora não tenha sido detectada uma barreira completamente funcional durante a interação entre parasitas e suas vesículas. Em relação à permeabilidade, otimizamos o controle positivo para a realização dos experimentos, mas, conforme destacado pela padronização de Kus et al. (2023), vários fatores precisam ser considerados para obter um epitélio completamente eficiente.

Em contraste, o artigo de Hofmann Macedo et al. (2020), que também utilizou um modelo 3D, demonstrou que a co-cultura de células Caco-2 com células HT-29-MTX e a presença de uma matriz extracelular mais complexa resultaram em uma redução do TEER e aumento da permeabilidade paracelular.

No estudo de Macedo et al. (2020), que também utilizou um modelo 3D, demonstrou que a co-cultura de células Caco-2 com células HT-29-MTX, associada à presença de uma matriz extracelular mais complexa, incluindo fibroblastos, resultou em uma redução do TEER e aumento da permeabilidade paracelular, aproximando os resultados das condições fisiológicas *in vivo* e tornando o modelo mais sensível às variações na barreira intestinal. Isso estabelece um critério interessante para a comparação de TEER e permeabilidade celular ao avaliar os efeitos em culturas 3D. De forma semelhante, nossos resultados com a co-cultura de células Caco-2 e HT-29 mostraram um aumento na permeabilidade epitelial em todas as condições testadas, incluindo infecção por *G. intestinalis*, tratamento com gEVs e a combinação de ambos (Figura 41). Tal efeito pode ser devido a alterações na composição da matriz extracelular ou na dinâmica das junções intercelulares.

Interessantemente, foi demonstrado que a exposição das células epiteliais às VEs de *Fusobacterium nucleatum* causou uma redução significativa do TEER e aumento da permeabilidade da barreira intestinal, indicando que as VEs comprometem as junções apertadas entre as células epiteliais, favorecendo a permeabilidade paracelular (Liu et al., 2021). Além disso, as VEs induziram a morte celular através da via mediada por RIPK1, evidenciada pela presença de sinais de necroptose. Esses resultados corroboram com nossa hipótese de avaliar o efeito das vesículas na quebra da barreira intestinal, especialmente durante a interação com *G. intestinalis*, com o objetivo de explorar um mecanismo semelhante de quebra da barreira epitelial pela giardíase.

Durante a diferenciação celular, ocorrem mudanças na composição e na dinâmica das células, o que pode influenciar a liberação de VEs e liberação de diferentes tipos de vesículas como parte de sua resposta a estímulos externos. Como observado ao longo da diferenciação nos dias 10 e 21, inicialmente há uma população predominante de exossomos (SEVs), mas à medida que as células se diferenciam, essas vesículas aumentam de diâmetro (LEVs). Uma hipótese interessante é que esse aumento no tamanho das VEs pode estar relacionado ao processo de maturação e reconfiguração da célula epitelial. Já quando as células entram em contato com o parasita ou com suas VEs (gEVs), há um aumento adicional na liberação de vesículas. Esse aumento pode ser resultado da ativação de vias de sinalização celular que induzem a liberação de VEs, como uma resposta imunológica ou uma adaptação à invasão do parasita (Coakley et al., 2015).

Por fim, a maturação do epitélio intestinal em modelos *in vitro* ainda é um ponto de discussão na literatura. Embora muitos estudos utilizem um tempo médio de diferenciação de 21 dias (Briceño et al., 2016; Kämpfer et al., 2017; Macedo et al., 2020), outros relatam períodos mais longos, entre 21 e 28 dias (Wallace et al., 2014). No entanto, Oliveira et al. (2019) demonstraram a formação de um epitélio maduro em 10-11 dias, o que está em concordância com nossos resultados de padronização. Além disso, Nathani et al. (2023) obtiveram células Caco-2 polarizadas em 14 dias, enquanto Santos et al. (2018) relataram a maturação em 15 dias. Isso indica que o tempo de maturação deve ser ajustado conforme o experimento.

Nesse contexto, nosso estudo visa validar o modelo de barreira intestinal como um reflexo fenotípico da giardíase, e posteriormente analisar outros efeitos relevantes, como a apoptose, para entender melhor a resposta da barreira intestinal à infecção por *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares.

## 5.9 MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS CACO-2 POR VESÍCULAS EXTRACELULARES

Os resultados deste estudo mostraram que a exposição das células Caco-2 a diferentes concentrações de gEV e ao próprio parasita não levou a um aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), embora tenha sido observada uma oscilação elevada inicial. Esse achado contrasta com estudos anteriores que demonstraram que células Caco-2 são capazes de produzir ROS em resposta à infecção por *G. intestinalis* (Ma'ayeh et al., 2015). Uma possível explicação

para essa diferença pode estar no papel da arginina no metabolismo do parasita e na resposta oxidativa da célula hospedeira. *G. intestinalis* utiliza arginina como sua principal fonte de energia e, durante a co-incubação com células Caco-2, a privação desse aminoácido pode contribuir para a redução da produção de óxido nítrico (NO) pela célula hospedeira, um mecanismo previamente descrito como uma estratégia do parasita para evitar danos oxidativos (Eckmann et al., 2000).

Além disso, durante a interação com *G. intestinalis*, as células Caco-2 expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de NO, e NADPH oxidase 1 (NOX1), uma enzima envolvida na geração de ROS (Roxström-Lindquist et al., 2005). No entanto, os trofozoítos também desencadeiam respostas protetoras na célula hospedeira, incluindo a regulação de genes associados à defesa contra danos oxidativos, conforme identificado por Ma'ayeh et al. (2015). Isso sugere que, enquanto as células epiteliais intestinais (IECs) ativam um ataque oxidativo contra os trofozoítos, elas também acionam mecanismos para minimizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres sobre si mesmas.

Por outro lado, *G. intestinalis* possui um sistema antioxidante altamente eficiente, capaz de neutralizar as ROS geradas pelas células hospedeiras (Ma'ayeh et al., 2015). Essa capacidade pode facilitar a persistência dos trofozoítos na superfície celular e contribuir para a manutenção da infecção no epitélio intestinal. Considerando que as vesículas extracelulares de *Giardia* carregam moléculas bioativas derivadas do parasita, é possível que as gEV desempenhem um papel semelhante, suprimindo a resposta oxidativa da célula hospedeira. Dessa forma, os achados deste estudo sugerem que as gEV de *G. intestinalis* não induzem estresse oxidativo significativo nas células Caco-2 nas condições testadas, ou que a resposta oxidativa seja transitória e ocorra em um período diferente do avaliado. Para elucidar melhor o impacto dessas vesículas na fisiologia das células epiteliais intestinais, estudos futuros poderiam explorar os mecanismos antioxidantes específicos e em diferentes condições experimentais para uma compreensão mais ampla do papel dessas vesículas na interação parasita-hospedeiro.

## 6 CONCLUSÃO

O protozoário *G. intestinalis* libera VEs durante a interação com células hospedeiras, resultando em três subtipos distintos: gEVs (liberadas pelo parasita), hEVs (derivadas da célula hospedeira) e intEVs (formadas na interação parasita-hospedeiro). Essas VEs são capturadas pela célula hospedeira por mecanismos de internalização com perfis dinâmicos distintos. Notavelmente, as intEVs parecem explorar vias endocíticas específicas para maximizar sua internalização e influenciar o microambiente celular, possivelmente favorecendo a persistência do parasita, o que requer estudos adicionais para entender completamente o fenômeno.

A internalização das VEs é um processo ativo, dependente de energia, clatrina e dinamina, mas independente de caveolas e lipid rafts, sendo modulada pela atividade de tirosina quinase e macropinocitose. Além disso, demonstramos que *G. intestinalis* também é capaz de internalizar vesículas exógenas ou as próprias dele por endocitose mediada por dinamina, conforme evidenciado pela redução do “uptake” na presença do inibidor Dynasore, tornando mais interessante o fenômeno de comunicação celular durante a interação patógeno hospedeiro.

Ao desenvolver um modelo tridimensional (3D) do epitélio intestinal, com a cocultura de células Caco-2 e HT-29, mimetizamos condições mais fisiológicas e observamos que as vesículas e os trofozoítos de *G. intestinalis* induzem a redução da resistência elétrica transepitelial (TEER) e aumentam a permeabilidade paracelular, reforçando seu papel na quebra da barreira epitelial, dando a possibilidade de entender como se estabelece a diarreia e avaliar o papel dos parasitas, das vesículas extracelulares e do sinergismo entre elas na interação com o epitélio.

A análise lipidômica revelou um enriquecimento progressivo de lipídios nas LEVs após 24 de interação, e a modulação das classes lipídicas em intEVs sugerindo um papel importante para esses lipídios na patogênese, como a modulação da resposta imunológica do hospedeiro.

Complementarmente, a proteômica demonstrou que, inicialmente, as intEVs são enriquecidas com proteínas associadas à adesão e remodelamento do citoesqueleto, enquanto em estágios posteriores predominam proteínas relacionadas à evasão imunológica e à modulação da resposta inflamatória. Tanto lipidômica como proteômica mostram uma expressão diferenciada das moléculas durante a interação.

Compreender os mecanismos de comunicação celular mediados por VEs na interação patógeno-hospedeiro oferece novas perspectivas para o desenvolvimento

de estratégias terapêuticas direcionadas à modulação dessas vesículas em infecções como a giardíase.

## 7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após o desenvolvimento de um modelo que mimetiza as condições fisiológicas do epitélio intestinal, o próximo objetivo é aprofundar a investigação sobre o papel de *G. intestinalis* e suas vesículas extracelulares (gEVs) na patogênese da giardíase.

Dentre as principais perspectivas, pretende-se explorar a interação do parasita com a microbiota intestinal e sua influência na regulação de condições como desnutrição e síndromes associadas, elucidando os mecanismos de comunicação celular envolvidos.

Além disso, será avaliada a participação das gEVs na resposta imune, utilizando modelos 3D e explorando sua interação com macrófagos e/ou células dendríticas.

Por fim, experimentos de pré-tratamento com inibidores de “uptake”, validados neste estudo, serão conduzidos em células diferenciadas em monocamada para investigar a internalização das gEVs. O objetivo será bloquear o “uptake” e avaliar se essa inibição pode impedir a quebra da barreira intestinal, fornecendo novas evidências para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a giardíase.

## 8 REFERÊNCIAS

- Abdollahi, S. (2021). Extracellular vesicles from organoids and 3D culture systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 118(3), 1029–1049. <https://doi.org/10.1002/bit.27606>
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(3), 447–475.
- Adam, R. D. (2021). *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 34(4), e0002419. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neuro-Oncol.*, 113(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111(15), E1548–E1556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403683111>
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(6), 413–422. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2317>
- Antunes, F., Andrade, F., Araújo, F., Ferreira, D., & Sarmiento, B. (2013). Establishment of a triple co-culture in vitro cell model to study intestinal absorption of peptide drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 83(3), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.003>
- Argüello-García, R., Leitsch, D., Skinner-Adams, T., & Ortega-Pierres, M. G. (2020). Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for giardiasis. *Adv. Parasitol.*, 107, 1–282. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.003>
- Bajic, S. S., Cañas, M. A., Tolinacki, M., Badia, J., Sánchez, B., Golic, N., Margolles, A., Baldomá, L., & Ruas-Madiedo, P. (2020). Proteomic profile of extracellular vesicles released by *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 and their internalization by non-polarized HT29 cell line. *Sci. Rep.*, 10(1), 21829. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78920-z>
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., da Silveira, J. F., & Almeida, I. C. (2013). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J. Proteome Res.*, 12(2), 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>
- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular vesicles in cancer: Cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell*, 30(6), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>

Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., & Lamprecht, A. (2014). A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, *87*(2), 290–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>

Bernander, R., Palm, J. E., & Svärd, S. G. (2001). Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.*, *3*(1), 55–62.  
<https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00094.x>

Bertolone, L., Castagna, A., Manfredi, M., De Santis, D., Ambrosani, F., Antinori, E., Mulatero, P., Danese, E., Marengo, E., Barberis, E., Veneri, M., Martinelli, N., Friso, S., Pizzolo, F., & Olivieri, O. (2023). Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles highlights specific signatures for patients with primary aldosteronism. *Front. Endocrinol.*, *14*, 1096441.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1096441>

Berkman, D. S., Lescano, A. G., Gilman, R. H., Lopez, S. L., & Black, M. M. (2002). Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: A follow-up study. *Lancet*, *359*(9306), 564–571. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07744-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07744-9)

Bielska, E., Sisquella, M. A., Aldeieg, M., Birch, C., O'Donoghue, E. J., & May, R. C. (2018). Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nat. Commun.*, *9*(1), 1556.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03991-6>

Briceño, M. P., Nascimento, L. A., Nogueira, N. P., Barenco, P. V., Ferro, E. A., Rezende-Oliveira, K., Goulart, L. R., Alves, P. T., Barbosa, B. de F., Lima, W. R., & Silva, N. M. (2016). *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells. *J. Histochem. Cytochem.*, *64*(8), 459–469.  
<https://doi.org/10.1369/0022155416656349>

Buret, A., Gall, D. G., & Olson, M. E. (1991). Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol. Res.*, *77*(2), 109–114.  
<https://doi.org/10.1007/BF00935423>

Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, *160*(2), 75–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.*, *67*(8), 3703–3713.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3703-3713.1999>

Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.*, *14*(9), e1007250. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>

Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., & Cacciò, S. M. (2017). Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.*, *33*(7), 561–576.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.006>

- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. (2012). *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J. Immunol.*, *188*(4), 1942–1952. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>
- Chen, Q., Huang, G., Wu, W., Wang, J., Hu, J., Mao, J., Chu, P. K., Bai, H., & Tang, G. (2020). A hybrid eukaryotic-prokaryotic nanoplatform with photothermal modality for enhanced antitumor vaccination. *Adv. Mater.*, *32*(16), e1908185. <https://doi.org/10.1002/adma.201908185>
- Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics, and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*, *13*(10-11), 1554–1571. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200329>
- Christianson, H. C., Svensson, K. J., & Belting, M. (2014). Exosome and microvesicle mediated gene transfer in mammalian cells. *Semin. Cancer Biol.*, *28*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.007>
- Coakley, G., Maizels, R. M., & Buck, A. H. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles: The new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol.*, *31*(10), 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.009>
- Coelho, C. H., Durigan, M., Leal, D. A. G., Schneider, A. B., Franco, R. M. B., & Singer, S. M. (2017). Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *11*(10), e0006005. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006005>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *30*, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J. J., Schiffelers, R. M., & Vader, P. (2017). Cellular "uptake" of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J. Control. Release*, *266*, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.019>
- Cotton, J. A., Beatty, J. K., & Buret, A. G. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int. J. Parasitol.*, *41*(9), 925–933. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.05.002>
- De Carvalho, T. B., De Carvalho, L. R., Mascarini, L. M. (2006). Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo State, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, *48*(5). <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000500006>
- de la Torre-Escudero, E., Gerlach, J. Q., Bennett, A. P. S., Cwiklinski, K., Jewhurst, H. L., Huson, K. M., Joshi, L., Kilcoyne, M., O'Neill, S., Dalton, J. P., & Robinson, M. W. (2019). Surface molecules of extracellular vesicles secreted by the helminth pathogen *Fasciola hepatica* direct their internalization by host cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, *13*(1), e0007087. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007087>

Deatherage, B. L., & Cookson, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.*, *80*(6), 1948–1957.

<https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>

DiMarco, R. L., Hunt, D. R., Dewi, R. E., & Heilshorn, S. C. (2017). Improvement of paracellular transport in the Caco-2 drug screening model using protein-engineered substrates. *Biomaterials*, *129*, 152–162.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.023>

Di Prisco, M. C., Hagel, I., Lynch, N. R., Jiménez, J. C., Rojas, R., Gil, M., & Mata, E. (1998). Association between giardiasis and allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, *81*(3), 261–265. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)62823-2](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)62823-2)

Dizdar, V., Gilja, O. H., & Hausken, T. (2007). Increased visceral sensitivity in *Giardia*-induced postinfectious irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. Effect of the 5HT3-antagonist ondansetron. *Neurogastroenterol. Motil.*, *19*(12), 977–982. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.00988.x>

Eckmann, L. (2003). Mucosal defenses against *Giardia*. *Parasite Immunol.*, *25*(5), 259–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00634.x>

Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F., & Gillin, F. D. (2000). Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J. Immunol.*, *164*(3), 1478–1487. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1478>

Eichenberger, R. M., Ryan, S., Jones, L., Buitrago, G., Polster, R., Montes de Oca, M., Zuvelek, J., Giacomini, P. R., Dent, L. A., Engwerda, C. R., Field, M. A., Sotillo, J., & Loukas, A. (2018). Hookworm secreted extracellular vesicles interact with host cells and prevent inducible colitis in mice. *Front. Immunol.*, *9*, 850. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00850>

Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.*, *34*, 47–52.

El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X., et al. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, *12*, 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>

Embley, T. M., van der Giezen, M., Horner, D. S., Dyal, P. L., Bell, S., & Foster, P. G. (2003). Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life*, *55*(7), 387–395. <https://doi.org/10.1080/15216540310001592834>

Escobedo, A. A., Hanevik, K., Almirall, P., Cimerman, S., & Alfonso, M. (2014). Management of chronic *Giardia* infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, *12*(9), 1143–1157. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.942283>

Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and "uptake" of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, *11*, 108. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-108>

Evans-Osses, I., Mojoli, A., Monguió-Tortajada, M., Marcilla, A., Aran, V., Amorim, M., Inal, J., Borràs, F. E., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *Eur. J. Cell Biol.*, *96*(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.005>

Faria, C. P., Ferreira, B., Lourenço, Á., Guerra, I., Melo, T., Domingues, P., Domingues, M. D. R. M., Cruz, M. T., & Sousa, M. D. C. (2023). Lipidome of extracellular vesicles from *Giardia lamblia*. *PLoS One*, *18*(9), e0291292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291292>

Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, *24*(1), 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>

Gavinho, B., Sabatke, B., Feijoli, V., Rossi, I. V., da Silva, J. M., Evans-Osses, I., Palmisano, G., Lange, S., & Ramirez, M. I. (2020). 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.*, *10*, 417. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00417>

Gómez-Chávez, F., Murrieta-Coxca, J. M., Caballero-Ortega, H., Morales-Prieto, D. M., & Markert, U. R. (2023). Host-pathogen interactions mediated by extracellular vesicles in *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, *158*, 103957. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.103957>

Grajeda, B. I., De Chatterjee, A., Villalobos, C. M., Pence, B. C., Ellis, C. C., Enriquez, V., Roy, S., Roychowdhury, S., Neumann, A. K., Almeida, I. C., Patterson, S. E., & Das, S. (2022). Giardial lipid rafts share virulence factors with secreted vesicles and participate in parasitic infection in mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, *12*, 974200. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.974200>

Guidi, R., Levi, L., Rouf, S. F., Puiac, S., Rhen, M., & Frisan, T. (2013). *Salmonella enterica* delivers its genotoxin through outer membrane vesicles secreted from infected cells. *Cell. Microbiol.*, *15*(12), 2034–2050. <https://doi.org/10.1111/cmi.12172>

Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D cell culture systems: Tumor application, advantages, and disadvantages. *Int. J. Mol. Sci.*, *22*(22), 12200. <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>

Hailegebriel, T. (2017). Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among students at Dona Berber primary school, Bahir Dar, Ethiopia. *BMC Infect. Dis.*, *17*(1), 362. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2466-x>

Hajare, S. T., Chekol, Y., & Chauhan, N. M. (2022). Assessment of prevalence of *Giardia lamblia* infection and its associated factors among government elementary school children from Sidama zone, SNNPR, Ethiopia. *PLoS One*, *17*(3), e0264812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264812>

Hassani, K., & Olivier, M. (2013). Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: a comparative proteomic and functional

analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7(5), e2185.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002185>

He, R. W., Braakhuis, H. M., Vandebriel, R. J., Staal, Y. C. M., Gremmer, E. R., Fokkens, P. H. B., Kemp, C., Vermeulen, J., Westerink, R. H. S., & Cassee, F. R. (2021). Optimization of an air-liquid interface in vitro cell co-culture model to estimate the hazard of aerosol exposures. *J. Aerosol Sci.*, 153, 105703.

<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2020.105703>

Holthaus, D., Kraft, M. R., Krug, S. M., Wolf, S., Müller, A., Delgado Betancourt, E., Schorr, M., Holland, G., Knauf, F., Schulzke, J. D., Aebischer, T., & Klotz, C. (2022). Dissection of barrier dysfunction in organoid-derived human intestinal epithelia induced by *Giardia duodenalis*. *Gastroenterology*, 162(3), 844–858.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.022>

Honorato, L., de Araujo, J. F. D., Ellis, C. C., Piffer, A. C., Pereira, Y., Frases, S., de Sousa Araújo, G. R., Pontes, B., Mendes, M. T., Pereira, M. D., Guimarães, A. J., da Silva, N. M., Vargas, G., Joffe, L., Del Poeta, M., Nosanchuk, J. D., Zamith-Miranda, D., Dos Reis, F. C. G., de Oliveira, H. C., Rodrigues, M. L., ...

Nimrichter, L. (2022). Extracellular vesicles regulate biofilm formation and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. *mBio*, 13(3), e0030122.

<https://doi.org/10.1128/mbio.00301-22>

Huyan, T., DU, Y., Huang, Q., Huang, Q., & Li, Q. (2018). "Uptake" characterization of tumor cell-derived exosomes by natural killer cells. *Iranian J. Public Health*, 47(6), 803–813.

Jing Zhang, Jeffrey Penny & Jian R. Lu. (2020). Development of a novel in vitro 3D intestinal model for permeability evaluations. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 71(5), 549-562. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1700940>

Joshi, B. S., de Beer, M. A., Giepmans, B. N. G., & Zuhorn, I. S. (2020). Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes. *ACS Nano*, 14(4), 4444–4455. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10033>

Jurgielewicz, B. J., Yao, Y., & Stice, S. L. (2020). Kinetics and specificity of HEK293T extracellular vesicle "uptake" using imaging flow cytometry. *Nanoscale Res. Lett.*, 15(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03399-6>

Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 19(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>

Kämpfer, A. A. M., Urbán, P., Gioria, S., Kanase, N., Stone, V., & Kinsner-Ovaskainen, A. (2017). Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. *Toxicol. In Vitro*, 45(Pt 1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.011>

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

Khowawisetsut, L., Vimonpatranon, S., Lekmanee, K., Sawasdipokin, H., Srimark, N., Chotivanich, K., & Pattanapanyasat, K. (2023). Differential effect of

extracellular vesicles derived from *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells on monocyte polarization. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(3), 2631.

<https://doi.org/10.3390/ijms24032631>

Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. A., & Gasser, R. B. (2014). *Giardia*/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol. Adv.*, 32(2), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.009>

Kraft, M. R., Klotz, C., Bücken, R., Schulzke, J. D., & Aebischer, T. (2017). *Giardia*'s epithelial cell interaction in vitro: Mimicking asymptomatic infection? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7, 421. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00421>

Kus, M., Ibragimow, I., & Piotrowska-Kempisty, H. (2023). Caco-2 cell line standardization with pharmaceutical requirements and in vitro model suitability for permeability assays. *Pharmaceutics*, 15(11), 2523.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112523>

Lalle, M. (2010). Giardiasis in the post-genomic era: treatment, drug resistance, and novel therapeutic perspectives. *Infect. Dis. Drug Targets*, 10(4), 283–294.

<https://doi.org/10.2174/187152610791591610>

Lane, S., & Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28(2), 123–147.

<https://doi.org/10.1080/1040-840291046713>

Leitsch, D. (2015). Drug resistance in the microaerophilic parasite *Giardia lamblia*. *Curr. Trop. Med. Rep.*, 2(3), 128–135. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0051-1>

Li, Y., Liu, Y., Xiu, F., Wang, J., Cong, H., He, S., Shi, Y., Wang, X., Li, X., & Zhou, H. (2018). Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int. J. Nanomedicine*, 13, 467–477. <https://doi.org/10.2147/IJN.S151110>

Lin, W. C., Tsai, C. Y., Huang, J. M., Wu, S. R., Chu, L. J., & Huang, K. Y. (2019). Quantitative proteomic analysis and functional characterization of *Acanthamoeba castellanii* exosome-like vesicles. *Parasites Vectors*, 12(1), 467.

<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3725-z>

Liu, L., Liang, L., Yang, C., Zhou, Y., & Chen, Y. (2021). Extracellular vesicles of *Fusobacterium nucleatum* compromise intestinal barrier through targeting RIPK1-mediated cell death pathway. *Gut Microbes*, 13(1), 1–20.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902718>

Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Nash, T. E. (2004). Mechanisms of *Giardia lamblia* lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect. Immun.*, 72(6), 3536–3542.

Ma'ayeh, S. Y., Knörr, L., & Svärd, S. G. (2015). Transcriptional profiling of *Giardia intestinalis* in response to oxidative stress. *Int. J. Parasitol.*, 45(14), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.005>

Ma'ayeh, S. Y., Knörr, L., Sköld, K., Garnham, A., Ansell, B. R. E., Jex, A. R., & Svärd, S. G. (2018). Responses of the differentiated intestinal epithelial cell line Caco-2 to infection with the *Giardia intestinalis* GS isolate. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 8, 244. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00244>

Macedo, M. H., Martínez, E., Barrias, C. C., & Sarmiento, B. (2020). Development of an improved 3D in vitro intestinal model to perform permeability studies of paracellular compounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8, 524018.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.524018> □ Maia-Brigagão, C., Morgado-Díaz, J. A., & De Souza, W. (2012). *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol. Int.*, 61(2), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.11.002>

Mantel, P. Y., & Marti, M. (2014). The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell. Microbiol.*, 16(3), 344–354. <https://doi.org/10.1111/cmi.12259>

Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Minguez, M. T., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Muñoz-Antoli, C., Toledo, R., & Bernal, D. (2012). Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*, 7(9), e45974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045974>

Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., et al. (2019). Specificities of secretion and "uptake" of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.*, 21, 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>

Mayor, S., Parton, R. G., & Donaldson, J. G. (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 6(6), a016758. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a01675>

Mbagwu, S. I., Lannes, N., Walch, M., Filgueira, L., & Mantel, P. Y. (2019). Human microglia respond to malaria-induced extracellular vesicles. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010021>

Mekonnen, H. S., & Ekubagewargies, D. T. (2019). Prevalence and factors associated with intestinal parasites among under-five children attending Woreta Health Center, Northwest Ethiopia. *BMC Infect. Dis.*, 19(1), 256. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3884-8>

Midlej, V., de Souza, W., & Benchimol, M. (2019). The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. *J. Struct. Biol.*, 207(3), 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.07.002>

Motta, M. E. F. A., Silva, G. A. P. da. (2002). Diarréia por parasitas. *Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.*, 2(2), 117–127. <https://doi.org/10.1590/S1519-38292002000200004>

Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle "uptake". *J. Extracell. Vesicles*, 3, 24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>

- Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R., & Yoshiyama, H. (2013). Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J. Virol.*, *87*(18), 10334–10347. <https://doi.org/10.1128/JVI.01310-13>
- Natali, L., Luna Pizarro, G., Moyano, S., de la Cruz-Thea, B., Musso, J., Rópolo, A. S., Eichner, N., Meister, G., Musri, M. M., Feliziani, C., & Touz, M. C. (2023). The exosome-like vesicles of *Giardia* Assemblages A, B, and E are involved in the delivering of distinct small RNA from parasite to parasite. *Int. J. Mol. Sci.*, *24*(11), 9559. <https://doi.org/10.3390/ijms24119559>
- Nathani, S., Das, N., Katiyar, P., Waghmode, B., Sircar, D., & Roy, P. (2023). Consumption of honey ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction via upregulation of tight junction proteins. *Eur. J. Nutr.*, *62*(7), 3033–3054. <https://doi.org/10.1007/s00394-023-03203-y>
- Okyay, P., Ertug, S., Gultekin, B., Onen, O., & Beser, E. (2004). Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample—Turkey. *BMC Public Health*, *4*, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-4-64>
- Oliveira, R. B., Canuto, L. P., & Collares-Buzato, C. B. (2019). Intestinal luminal content from high-fat-fed prediabetic mice changes epithelial barrier function in vitro. *Life Sci.*, *216*, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.012>
- Pan, F., Han, L., Zhang, Y., Yu, Y., & Liu, J. (2015). Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, *66*(6), 680–685. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>
- Paradiso, F., Serpelloni, S., Francis, L. W., & Taraballi, F. (2021). Mechanical studies of the third dimension in cancer: From 2D to 3D model. *Int. J. Mol. Sci.*, *22*(18), 10098. <https://doi.org/10.3390/ijms221810098>
- Pavkova, I., Klimentova, J., Bavlovic, J., Horcickova, L., Kubelkova, K., Vlcak, E., Raabova, H., Filimonenko, V., Ballek, O., & Stulik, J. (2021). *Francisella tularensis* outer membrane vesicles participate in the early phase of interaction with macrophages. *Front. Microbiol.*, *12*, 748706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748706>
- Pittner, E., et al. (2010). Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. *Rev. Salus*, *1*(1). Prabakaran, M., Weible, L. J., Champlain, J. D., Jiang, R. Y., Biondi, K., Weil, A. A., Van Voorhis, W. C., & Ojo, K. K. (2023). The gut-wrenching effects of cryptosporidiosis and giardiasis in children. *Microorganisms*, *11*(9), 2323. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092323>
- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., Carranza, P. G., & Luján, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, *456*(7223), 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature07585>

Platts-Mills, J. A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B. J., McGrath, M., Olortegui, M. P., Samie, A., Shakoob, S., Mondal, D., Lima, I. F., Hariraju, D., Rayamajhi, B. B., Qureshi, S., Kabir, F., Yori, P. P., Mufamadi, B., Amour, C., ... MAL-ED Network Investigators. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob. Health*, 3(9), e564–e575.

[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(15\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(15)00151-5)

Rädler, J., Gupta, D., Zickler, A., & Andaloussi, S. E. (2023). Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading. *Mol therapy: the Jour of the American Society of Gene Therapy*, 31(5), 1231–1250. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.013>

Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., & Evans-Osses, I. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cell. Microbiol.*, 19(4), 12672. <https://doi.org/10.1111/cmi.12672>

Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, 200(4), 373–383.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

Reale, O., Huguet, A., & Fessard, V. (2020). Co-culture model of Caco-2/HT29-MTX cells: A promising tool for investigation of phycotoxins toxicity on the intestinal barrier. *Chemosphere*, 128497.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128497>

Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.*, 14(3), 195–208.

<https://doi.org/10.1038/nri3622>

Rocha, S., Carvalho, J., Oliveira, P., Voglstaetter, M., Schwartz, D., Thomsen, A. R., Walter, N., Khanduri, R., Sanchez, J. C., Keller, A., Oliveira, C., & Nazarenko, I. (2019). 3D cellular architecture affects microRNA and protein cargo of extracellular vesicles. *Adv. Sci.*, 6(4), 1800948.

<https://doi.org/10.1002/advs.201800948>

Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., & Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot. Cell*, 7(1), 58–67. <https://doi.org/10.1128/EC.00370-07>

Roerig, J., Schiller, L., Kalwa, H., Hause, G., Vissiennon, C., Hacker, M. C., Wölk, C., & Schulz-Siegmund, M. (2021). A focus on critical aspects of "uptake" and transport of milk-derived extracellular vesicles across the Caco-2 intestinal barrier model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 166, 61–74.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.026>

Rossi, I. V., de Almeida, R. F., Sabatke, B., de Godoy, L. M. F., & Ramirez, M. I. (2024). *Trypanosoma cruzi* interaction with host tissues modulate the composition

of large extracellular vesicles. *Sci. Rep.*, 14(1), 5000.

<https://doi.org/10.1038/s41598-024-55302-3>

Roxström-Lindquist, K., Ringqvist, E., Palm, D., & Svärd, S. (2005). *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 73(12), 8204–8208.

<https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8204-8208.2005>

Sabatke, B., Rossi, I. V., Sana, A., Bonato, L. B., & Ramirez, M. I. (2024). Extracellular vesicles biogenesis and "uptake" concepts: A comprehensive guide to studying host-pathogen communication. *Mol. Microbiol.*, 122(5), 613–629.

<https://doi.org/10.1111/mmi.15168>

Salas, N., Blasco Pedreros, M., Dos Santos Melo, T., Maguire, V. G., Sha, J., Wohlschlegel, J. A., Pereira-Neves, A., & de Miguel, N. (2023). Role of cytoneme structures and extracellular vesicles in *Trichomonas vaginalis* parasite-parasite communication. *eLife*, 12, e86067. <https://doi.org/10.7554/eLife.86067>

Santos, P. S., Caria, C. R. P., Gotardo, E. M. F., Ribeiro, M. L., Pedrazzoli, J., & Gambero, A. (2018). Artificial sweetener saccharin disrupts intestinal epithelial cells' barrier function in vitro. *Food Funct.*, 9(7), 3815–3822.

<https://doi.org/10.1039/c8fo00883c>

Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.*, 22(5), 203–208.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>

Schorey, J. S., & Harding, C. V. (2016). Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J. Clin. Invest.*, 126(4), 1181–1189.

<https://doi.org/10.1172/JCI81132>

Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.*, 16(1), 24–43.

<https://doi.org/10.15252/embr.201439363>

Scott, K. G., Yu, L. C., & Buret, A. G. (2004). Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect. Immun.*, 72(6), 3536–3542.

<https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3536-3542.2004>

Sen, R., Nayak, L., & De, R. K. (2016). A review on host-pathogen interactions: classification and prediction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 35(10), 1581–1599.

<https://doi.org/10.1007/s10096-016-2716-7>

Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.*, 1(6), 2856–2860.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>

Shlomovitz, I., Erlich, Z., Arad, G., Edry-Botzer, L., Zargarian, S., Cohen, H., Manko, T., Ofir-Birin, Y., Cooks, T., Regev-Rudzki, N., & Gerlic, M. (2021). Proteomic analysis of necroptotic extracellular vesicles. *Cell Death Dis.*, 12(11), 1059.

<https://doi.org/10.1038/s41419-021-04317-z>

- Silverman, J. M., & Reiner, N. E. (2011). Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell. Microbiol.*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x>
- Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J., & Reiner, N. E. (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.*, 9(2), R35. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-r35>
- Sohal, I. S., & Kasinski, A. L. (2023). Emerging diversity in extracellular vesicles and their roles in cancer. *Front. Oncol.*, 13, 1167717. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1167717>
- Solaymani-Mohammadi, S., & Singer, S. M. (2011). Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *J. Immunol.*, 187(7), 3769–3775. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100606>
- Solomons, N. W. (1982). Giardiasis: nutritional implications. *Rev. Infect. Dis.*, 4(4), 859–869. <https://doi.org/10.1093/4.4.859>
- Sorkin, A., & Goh, L. K. (2008). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.*, 314(17), 3093–3106. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.08.013>
- Sousa, M. C., Morais, J. B., Machado, J. E., & Poiars-da-Silva, J. (2006). Genotyping of *Giardia lamblia* human isolates from Portugal by PCR-RFLP and sequencing. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(Suppl 1), S174–S176. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00221.x>
- Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., & Belting, M. (2013). Exosome "uptake" depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.*, 288(24), 17713–17724. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445403>
- Szempruch, A. J., Sykes, S. E., Kieft, R., Dennison, L., Becker, A. C., Gartrell, A., Martin, W. J., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., Hajduk, S. L., & Harrington, J. M. (2016). Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell*, 164(1-2), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>
- 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 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thompson, A. G., Gray, E., Heman-Ackah, S. M., Mäger, I., Talbot, K., Andaloussi, S. E., Wood, M. J., & Turner, M. R. (2016). Extracellular vesicles in neurodegenerative disease - pathogenesis to biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.*, 12(6), 346–357. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.68>

Toribio, V., Morales, S., López-Martín, S., et al. (2019). Development of a quantitative method to measure EV "uptake". *Sci. Rep.*, 9, 10522. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47023-9>

Troeger, H., Epple, H. J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G. D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56(3), 328–335. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.100198>

Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host:parasite interactions. *PLoS Pathog.*, 9, e1003482.

Wagner, T., Joshi, B., Janice, J., Askarian, F., Škalko-Basnet, N., Hagestad, O. C., Mekhlif, A., Wai, S. N., Hegstad, K., & Johannessen, M. (2018). *Enterococcus faecium* produces membrane vesicles containing virulence factors and antimicrobial resistance related proteins. *J. Proteomics*, 187, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.05.017>

Wallace, C. J., Medina, S. H., & ElSayed, M. E. (2014). Effect of rhamnolipids on permeability across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.*, 31(4), 887–894. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1210-5>

Wang, D., Liu, C., You, S., Zhang, K., Li, M., Cao, Y., Wang, C., Dong, H., Zhang, X. (2020). Bacterial vesicle-cancer cell hybrid membrane-coated nanoparticles for tumor-specific immune activation and photothermal therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 12(37), 41138–41147. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c13169>

Wentz-Hunter, K. K., & Potashkin, J. A. (2011). The role of miRNAs as key regulators in the neoplastic microenvironment. *Mol. Biol. Int.*, 2011, 839872. <https://doi.org/10.4061/2011/839872>

Yang, A. S. P., Lopaticki, S., O'Neill, M. T., Erickson, S. M., Douglas, D. N., Kneteman, N. M., & Boddey, J. A. (2017). AMA1 and MAEBL are important for *Plasmodium falciparum* sporozoite infection of the liver. *Cell. Microbiol.*, 19(9), 10.1111/cmi.12745. <https://doi.org/10.1111/cmi.12745>

Ye, Q., Tian, H., Chen, B., Shao, J., Qin, Y., & Wen, J. (2017). *Giardia's* primitive GPL biosynthesis pathways with parasitic adaptation 'patches': implications for *Giardia's* evolutionary history and for finding targets against giardiasis. *Sci. Rep.*, 7(1), 9507. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10054-1>

Yichoy, M., Nakayasu, E. S., Shpak, M., Aguilar, C., Aley, S. B., Almeida, I. C., & Das, S. (2009). Lipidomic analysis reveals that phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine are newly generated phospholipids in an early-divergent protozoan, *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 165(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.01.004>

Yin, L., Liu, X., Shi, Y., Ocansey, D. K. W., Hu, Y., Li, X., Zhang, C., Xu, W., & Qian, H. (2020). Therapeutic advances of stem cell-derived extracellular vesicles in regenerative medicine. *Cells*, 9(3), 707. <https://doi.org/10.3390/cells9030707>

Zamith-Miranda, D., Heyman, H. M., Couvillion, S. P., Cordero, R. J. B., Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Casadevall, A., Amatuzzi, R. F., Alves, L. R., Nakayasu, E. S., & Nosanchuk, J. D. (2021). Comparative molecular and immunoregulatory analysis of extracellular vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems*, 6(4), e0082221.

<https://doi.org/10.1128/mSystems.00822-21>

Zauli, R. C., de Souza Perez, I. C., de Moraes, A. C. C., Ciaccio, A. C., Vidal, A. S., Soares, R. P., Torrecilhas, A. C., Batista, W. L., & Xander, P. (2023). Extracellular vesicles released by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes with distinct virulence profile differently modulate the macrophage functions. *Microorganisms*, 11(12), 2973.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11122973>

## ANEXO 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS OBTIDAS DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Protein_ID_gEV_1h	Protein_Name_gEV_1h	Protein_ID_gEV_24h	Protein_Name_gEV_24h
GL50803_10091-t26_1	Ribosomal protein L23	GL50803_10038-t26_1	Globin family profile domain-containing protein
GL50803_101074-t26_1	VSP with INR	GL50803_10073-t26_1	Lactotransferrin
GL50803_101278-t26_1	hypothetical protein	GL50803_100864-t26_1	Large ribosomal subunit protein uL16
GL50803_136021-t26_1	Tubulin beta chain	GL50803_100906-t26_1	Hemoglobin subunit alpha
GL50803_86934-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_10091-t26_1	Actin, cytoplasmic 2
GL50803_101501-t26_1	Seryl-tRNA synthetase	GL50803_101074-t26_1	Alpha-2-macroglobulin
GL50803_101534-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_101278-t26_1	Tubulin beta-4A chain
GL50803_101906-t26_1	Vesicle-fusing ATPase	GL50803_136021-t26_1	Tubulin beta chain
GL50803_102101-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein	GL50803_86934-t26_1	Tubulin alpha-3C chain
GL50803_102108-t26_1	Clathrin heavy chain	GL50803_101501-t26_1	Heat shock cognate 71 kDa protein
GL50803_10231-t26_1	TCP-1 chaperonin subunit zeta	GL50803_101534-t26_1	Elongation factor 2
GL50803_10255-t26_1	Putative Translation initiation factor eIF-4A	GL50803_101850-t26_1	Alpha-18 giardin
GL50803_10311-t26_1	Ornithine transcarbamylase	GL50803_101906-t26_1	Alpha-12 giardin
GL50803_103373-t26_1	Alpha-7.1 giardin	GL50803_101918-t26_1	Vacuolar protein sorting 26, putative
GL50803_103437-t26_1	Alpha-9 giardin	GL50803_10196-t26_1	Dynein heavy chain, putative
GL50803_10367-t26_1	Ribosomal protein S24	GL50803_102101-t26_1	Ribosomal protein L23
GL50803_112079-t26_1	Tubulin alpha chain	GL50803_102108-t26_1	VSP with INR
GL50803_103709-t26_1	BRO1 domain-containing protein	GL50803_10231-t26_1	hypothetical protein
GL50803_103713-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_102444-t26_1	Tubulin beta chain
GL50803_103944-t26_1	Kinase, NEK	GL50803_10255-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_104150-t26_1	Serine/threonine-protein kinase PLK	GL50803_102813-t26_1	Seryl-tRNA synthetase
GL50803_104173-t26_1	Isoleucyl-tRNA synthetase	GL50803_103059-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_3910-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_10311-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_10428-t26_1	Ribosomal L16 domain-containing protein	GL50803_10324-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_10429-t26_1	CS domain-containing protein	GL50803_103373-t26_1	hypothetical protein
GL50803_10521-t26_1	Arginyl-tRNA synthetase	GL50803_103437-t26_1	hypothetical protein
GL50803_10570-t26_1	Peptidylprolyl isomerase	GL50803_10367-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein
GL50803_10698-t26_1	Phosphorylase B kinase gamma catalytic chain	GL50803_112079-t26_1	Clathrin heavy chain
GL50803_10822-t26_1	WD-40 repeat protein family	GL50803_103709-t26_1	TCP-1 chaperonin subunit zeta

GL50803_10870-t26_1	Aspartyl-tRNA synthetase	GL50803_103713-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_10885-t26_1	4-alpha-glucanotransferase, amylo-alpha-1,6-glucosidase	GL50803_103855-t26_1	Putative Translation initiation factor eIF-4A
GL50803_10919-t26_1	S10_pectin domain-containing protein	GL50803_103944-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_11043-t26_1	Fructose-bisphosphate aldolase	GL50803_104031-t26_1	Dynein heavy chain
GL50803_11118-t26_1	Phosphopyruvate hydratase	GL50803_104150-t26_1	Ornithine transcarbamylase
GL50803_11129-t26_1	hypothetical protein	GL50803_104173-t26_1	Ribulose-phosphate 3-epimerase
GL50803_11164-t26_1	Ankyrin repeat protein 1	GL50803_3910-t26_1	Alpha-7.1 giardin
GL50803_11186-t26_1	RRM domain-containing protein	GL50803_10428-t26_1	Alpha-9 giardin
GL50803_111936-t26_1	VSP	GL50803_10429-t26_1	Ribosomal protein S24
GL50803_112103-t26_1	Arginine deiminase	GL50803_10521-t26_1	Tubulin alpha chain
GL50803_11214-t26_1	Kinase, AGC PKA	GL50803_10570-t26_1	BRO1 domain-containing protein
GL50803_112312-t26_1	Elongation factor 1-alpha	GL50803_10577-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_11247-t26_1	Ribosomal protein L13a	GL50803_10608-t26_1	Vacuolar protein sorting 29
GL50803_112681-t26_1	Vesicle-fusing ATPase	GL50803_10609-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_112801-t26_1	VSP	GL50803_10623-t26_1	Glycogen
GL50803_112846-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein	GL50803_10661-t26_1	Serine/threonine-protein kinase PLK
GL50803_112885-t26_1	Pribosyltran domain-containing protein	GL50803_10698-t26_1	Isoleucyl-tRNA synthetase
GL50803_11301-t26_1	NDK domain-containing protein	GL50803_10708-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_113038-t26_1	Tenascin-like protein	GL50803_10778-t26_1	Ribosomal_L16 domain-containing protein
GL50803_113284-t26_1	Ankyrin repeat protein 2	GL50803_10780-t26_1	CS domain-containing protein
GL50803_113450-t26_1	VSP with INR	GL50803_10791-t26_1	Arginyl-tRNA synthetase
GL50803_114626-t26_1	High cysteine membrane protein EGF-like	GL50803_10822-t26_1	Peptidylprolyl isomerase
GL50803_113553-t26_1	Kinase, NEK	GL50803_10858-t26_1	Nop domain-containing protein
GL50803_11359-t26_1	40S ribosomal protein S4	GL50803_10868-t26_1	hypothetical protein
GL50803_113656-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein	GL50803_10870-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_113797-t26_1	VSP with INR	GL50803_10881-t26_1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)
GL50803_11380-t26_1	hypothetical protein	GL50803_10882-t26_1	UBA_e1_C domain-containing protein
GL50803_113892-t26_1	AMP-binding domain-containing protein	GL50803_10885-t26_1	Phosphorylase B kinase gamma catalytic chain
GL50803_11397-t26_1	CCT-beta	GL50803_10919-t26_1	Deacetylase sirtuin-type domain-containing protein
GL50803_114119-t26_1	Alpha-7.2 giardin	GL50803_11034-t26_1	hypothetical protein
GL50803_114246-t26_1	Obg-like ATPase 1	GL50803_11043-t26_1	Ribosomal protein S27
GL50803_11436-t26_1	ThiF domain-containing protein	GL50803_11044-t26_1	hypothetical protein
GL50803_114609-t26_1	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	GL50803_11118-t26_1	WD-40 repeat protein family

GL50803_114671-t26_1	ANK REP REGION domain-containing protein	GL50803_11129-t26_1	MYG1 protein
GL50803_114776-t26_1	Vesicle-fusing ATPase	GL50803_11164-t26_1	Vacuolar ATP synthase E subunit
GL50803_114777-t26_1	MFS domain-containing protein	GL50803_11186-t26_1	Aspartyl-tRNA synthetase
GL50803_114787-t26_1	Alpha-7.3 giardin	GL50803_112076-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_11521-t26_1	VSP	GL50803_112103-t26_1	hypothetical protein
GL50803_11554-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_11214-t26_1	4-alpha-glucanotransferase, amylo-alpha-1,6-glucosidase
GL50803_11654-t26_1	Alpha-1 giardin	GL50803_112312-t26_1	S10_pectin domain-containing protein
GL50803_11683-t26_1	Alpha-3 giardin	GL50803_11246-t26_1	hypothetical protein
GL50803_11950-t26_1	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	GL50803_11247-t26_1	Fructose-bisphosphate aldolase
GL50803_11992-t26_1	TCP-1 chaperonin subunit epsilon	GL50803_112681-t26_1	Mob1-like protein
GL50803_12102-t26_1	Elongation factor 1-gamma	GL50803_112801-t26_1	Phosphopyruvate hydratase
GL50803_121046-t26_1	Histone domain-containing protein	GL50803_112846-t26_1	hypothetical protein
GL50803_12108-t26_1	PALP domain-containing protein	GL50803_112885-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_12150-t26_1	Aminotran_1_2 domain-containing protein	GL50803_11301-t26_1	RRM domain-containing protein
GL50803_12216-t26_1	Vacuolar ATP synthase subunit B	GL50803_11311-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_12981-t26_1	Ribosomal_S7 domain-containing protein	GL50803_113284-t26_1	Arginine deiminase
GL50803_13268-t26_1	40S ribosomal protein S25	GL50803_113365-t26_1	Kinase, AGC PKA
GL50803_13350-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein	GL50803_113450-t26_1	Elongation factor 1-alpha
GL50803_1345-t26_1	Ribosomal protein L10a	GL50803_114626-t26_1	Protein DPCD
GL50803_13500-t26_1	CCT-theta	GL50803_113553-t26_1	Ribosomal protein L13a
GL50803_135003-t26_1	Histone H4	GL50803_11359-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_13584-t26_1	hypothetical protein	GL50803_113622-t26_1	VSP
GL50803_13603-t26_1	ATP synthase subunit E family protein	GL50803_11364-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein
GL50803_13608-t26_1	ATP-grasp domain-containing protein	GL50803_113662-t26_1	Pribosyltran domain-containing protein
GL50803_13651-t26_1	hypothetical protein	GL50803_113797-t26_1	NDK domain-containing protein
GL50803_137612-t26_1	VSP	GL50803_11380-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_137617-t26_1	VSP	GL50803_113892-t26_1	Ankyrin repeat protein 2
GL50803_137618-t26_1	VSP	GL50803_11390-t26_1	5-3 exoribonuclease 2
GL50803_137703-t26_1	Ankyrin repeat protein 1	GL50803_11397-t26_1	VSP with INR
GL50803_137713-t26_1	hypothetical protein	GL50803_114119-t26_1	High cysteine membrane protein EGF-like
GL50803_137716-t26_1	ANK REP REGION domain-containing protein	GL50803_114246-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_13864-t26_1	Heat shock protein HSP 90-alpha	GL50803_11436-t26_1	40S ribosomal protein S4
GL50803_13921-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_114497-t26_1	ANK REP REGION domain-containing protein

GL50803_13943-t26_1	S1 motif domain-containing protein	GL50803_114609-t26_1	kinase, AGC Akt
GL50803_13998-t26_1	Threonyl-tRNA synthetase	GL50803_114671-t26_1	WW domain-containing protein
GL50803_14019-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein	GL50803_114776-t26_1	VSP with INR
GL50803_14049-t26_1	Ribosomal protein L32	GL50803_114777-t26_1	hypothetical protein
GL50803_14171-t26_1	Ribosomal protein L37	GL50803_114787-t26_1	AMP-binding domain-containing protein
GL50803_14285-t26_1	Malate dehydrogenase	GL50803_11495-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_14311-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase	GL50803_115129-t26_1	CCT-beta
GL50803_14321-t26_1	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein	GL50803_115239-t26_1	Alpha-7.2 giardin
GL50803_14329-t26_1	40S ribosomal protein S7	GL50803_115479-t26_1	Obg-like ATPase 1
GL50803_14373-t26_1	Dynamin	GL50803_11554-t26_1	ThiF domain-containing protein
GL50803_14375-t26_1	Asparagine-tRNA ligase	GL50803_11595-t26_1	hypothetical protein
GL50803_14404-t26_1	PPM-type phosphatase domain-containing protein	GL50803_11654-t26_1	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase
GL50803_16076-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_11683-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_14551-t26_1	Alpha-6 giardin	GL50803_11740-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_14568-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase	GL50803_11950-t26_1	MFS domain-containing protein
GL50803_14586-t26_1	VSP with INR	GL50803_11953-t26_1	Alpha-7.3 giardin
GL50803_14620-t26_1	40S ribosomal protein S6	GL50803_11992-t26_1	Rab GDP dissociation inhibitor
GL50803_14622-t26_1	60S ribosomal protein L13	GL50803_12102-t26_1	hypothetical protein
GL50803_14651-t26_1	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	GL50803_121046-t26_1	Eukaryotic translation initiation factor 5B
GL50803_14699-t26_1	Ribosomal protein S23	GL50803_12105-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_14827-t26_1	Ribosomal_S17_N domain-containing protein	GL50803_12108-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_14859-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_12150-t26_1	Glycosyl transferase family protein
GL50803_14938-t26_1	Ribosomal protein L12	GL50803_12162-t26_1	Alpha-1 giardin
GL50803_15046-t26_1	Ribosomal protein L26	GL50803_12216-t26_1	Alpha-3 giardin
GL50803_15048-t26_1	ATP-dependent RNA helicase-like protein	GL50803_12223-t26_1	PPM-type phosphatase domain-containing protein
GL50803_15097-t26_1	Alpha-14 giardin	GL50803_12770-t26_1	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein
GL50803_15148-t26_1	Chaperone protein DnaJ	GL50803_12830-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_15214-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase	GL50803_12853-t26_1	TCP-1 chaperonin subunit epsilon
GL50803_15215-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase	GL50803_12981-t26_1	Elongation factor 1-gamma
GL50803_15228-t26_1	Ribosomal protein S15A	GL50803_13268-t26_1	Histone domain-containing protein
GL50803_15252-t26_1	UBC core domain-containing protein	GL50803_13273-t26_1	hypothetical protein
GL50803_15260-t26_1	Ribosomal protein S15	GL50803_13350-t26_1	PALP domain-containing protein
GL50803_15383-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_1345-t26_1	Aminotran_1_2 domain-containing protein

GL50803_15397-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_13452-t26_1	Phenylalanine--tRNA ligase
GL50803_15409-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_13500-t26_1	Vacuolar ATP synthase subunit B
GL50803_15411-t26_1	Kinase, NEK	GL50803_135003-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_15427-t26_1	Giardia trophozoite antigen GTA-2	GL50803_13550-t26_1	START domain-containing protein
GL50803_15428-t26_1	IFT81_CH domain-containing protein	GL50803_13561-t26_1	hypothetical protein
GL50803_15472-t26_1	Charged multivesicular body protein 1a	GL50803_13584-t26_1	ThiF domain-containing protein
GL50803_15520-t26_1	Ribosomal protein L21	GL50803_13603-t26_1	Ribosomal_S7 domain-containing protein
GL50803_15551-t26_1	Ribosomal protein S18	GL50803_13608-t26_1	40S ribosomal protein S25
GL50803_15567-t26_1	Rab2a	GL50803_13651-t26_1	Axonemal dynein light chain
GL50803_15823-t26_1	1,4-alpha-glucan branching enzyme	GL50803_13747-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein
GL50803_15869-t26_1	GTP-binding nuclear protein	GL50803_137612-t26_1	Ribosomal protein L10a
GL50803_15983-t26_1	Prolyl-tRNA synthetase	GL50803_137617-t26_1	Regulator of nonsense transcripts 1-like protein
GL50803_16044-t26_1	hypothetical protein	GL50803_137618-t26_1	CCT-theta
GL50803_16086-t26_1	Ribosomal_L2_C domain-containing protein	GL50803_137695-t26_1	Histone H4
GL50803_16114-t26_1	Ribosomal protein L36-1	GL50803_137698-t26_1	Rho-GAP domain-containing protein
GL50803_16124-t26_1	T-complex protein 1 subunit eta	GL50803_137703-t26_1	EF1_GNE domain-containing protein
GL50803_16125-t26_1	FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GL50803_137716-t26_1	hypothetical protein
GL50803_16235-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_137733-t26_1	ATP synthase subunit E family protein
GL50803_16265-t26_1	40S ribosomal protein S3a	GL50803_13864-t26_1	ATP-grasp domain-containing protein
GL50803_16298-t26_1	Ribosomal_S27 domain-containing protein	GL50803_13875-t26_1	hypothetical protein
GL50803_16310-t26_1	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein	GL50803_13914-t26_1	C4 group specific protein
GL50803_16312-t26_1	Hypothetical protein	GL50803_13921-t26_1	VSP
GL50803_16368-t26_1	Ribosomal protein L31B	GL50803_13943-t26_1	VSP
GL50803_16376-t26_1	ATP-dependent RNA helicase p47, putative	GL50803_13981-t26_1	VSP
GL50803_16384-t26_1	hypothetical protein	GL50803_13996-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_16387-t26_1	60S ribosomal protein L18a	GL50803_13998-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_16412-t26_1	Heat-shock protein, putative	GL50803_14019-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_16424-t26_1	Disc-associated protein	GL50803_14049-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_16431-t26_1	Ribosomal_L19e domain-containing protein	GL50803_14091-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_16443-t26_1	Protein phosphatase 2A B regulatory subunit Wdb1	GL50803_14104-t26_1	Heat shock protein HSP 90-alpha
GL50803_16453-t26_1	Carbamate kinase	GL50803_14135-t26_1	Myotubularin phosphatase domain-containing protein
GL50803_16525-t26_1	Ribosomal protein L3	GL50803_14171-t26_1	VID27 domain-containing protein

GL50803_16549-t26_1	AAA domain-containing protein	GL50803_14223-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_16567-t26_1	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A	GL50803_14285-t26_1	S1 motif domain-containing protein
GL50803_16636-t26_1	Rab2b	GL50803_14311-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_16652-t26_1	Ribosomal_S13_N domain-containing protein	GL50803_14318-t26_1	Alpha-15 giardin
GL50803_16653-t26_1	FYVE-type domain-containing protein	GL50803_14321-t26_1	Threonyl-tRNA synthetase
GL50803_16667-t26_1	CoA_binding domain-containing protein	GL50803_14329-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein
GL50803_16745-t26_1	Axoneme-associated protein GASP-180	GL50803_14364-t26_1	Ribosomal protein L32
GL50803_16760-t26_1	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	GL50803_14373-t26_1	Ribosomal_L14e domain-containing protein
GL50803_16795-t26_1	Vesicle-fusing ATPase	GL50803_14375-t26_1	DUF676 domain-containing protein
GL50803_16802-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_14404-t26_1	DM10 domain-containing protein
GL50803_16824-t26_1	Kinase, NEK	GL50803_14434-t26_1	Ribosomal protein L37
GL50803_16867-t26_1	AAA family ATPase	GL50803_14456-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_16945-t26_1	Kinesin-like protein	GL50803_14460-t26_1	Malate dehydrogenase
GL50803_1695-t26_1	Rab11	GL50803_16076-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_16967-t26_1	Kinase, NEK	GL50803_14551-t26_1	hypothetical protein
GL50803_17053-t26_1	Ankyrin repeat protein 1	GL50803_14568-t26_1	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein
GL50803_17054-t26_1	60S acidic ribosomal protein P0	GL50803_14584-t26_1	40S ribosomal protein S7
GL50803_17055-t26_1	Spindle pole protein, putative	GL50803_14586-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_17056-t26_1	Ribosomal_L6 domain-containing protein	GL50803_14603-t26_1	Dynamin
GL50803_17060-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_14606-t26_1	Asparagine--tRNA ligase
GL50803_17063-t26_1	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	GL50803_14620-t26_1	PPM-type phosphatase domain-containing protein
GL50803_17105-t26_1	IFT complex B	GL50803_14622-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_17121-t26_1	Bip	GL50803_14651-t26_1	Acid phosphatase
GL50803_17143-t26_1	Pyruvate kinase	GL50803_14661-t26_1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
GL50803_17153-t26_1	Alpha-11 giardin	GL50803_14699-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_17190-t26_1	eRF1_1 domain-containing protein	GL50803_14704-t26_1	Alpha-6 giardin
GL50803_17230-t26_1	Gamma giardin	GL50803_14742-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_17244-t26_1	60S ribosomal protein L7a	GL50803_14759-t26_1	Kelch repeat-containing protein
GL50803_17245-t26_1	hypothetical protein	GL50803_14787-t26_1	VSP with INR
GL50803_17255-t26_1	hypothetical protein	GL50803_14827-t26_1	Nudix hydrolase domain-containing protein
GL50803_17304-t26_1	Adaptin_N domain-containing protein	GL50803_14859-t26_1	Eukaryotic translation initiation factor 6
GL50803_17332-t26_1	hypothetical protein	GL50803_14874-t26_1	40S ribosomal protein S6
GL50803_17364-t26_1	40S ribosomal protein S26	GL50803_14934-t26_1	60S ribosomal protein L13

GL50803_17395-t26_1	Ribosomal_L18_c domain-containing protein	GL50803_14938-t26_1	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase
GL50803_17400-t26_1	Cyclin	GL50803_14961-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_17411-t26_1	T-complex protein 1 subunit gamma	GL50803_14993-t26_1	Ribosomal protein S23
GL50803_17460-t26_1	Tr-type G domain-containing protein	GL50803_15046-t26_1	hypothetical protein
GL50803_17482-t26_1	T-complex protein 1 subunit delta	GL50803_15048-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_17483-t26_1	J domain-containing protein	GL50803_15054-t26_1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
GL50803_17547-t26_1	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein	GL50803_15078-t26_1	IPPC domain-containing protein
GL50803_17566-t26_1	Non-specific serine/threonine protein kinase	GL50803_15090-t26_1	Ribosomal_S17_N domain-containing protein
GL50803_17568-t26_1	Protein 21.1	GL50803_15097-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_17570-t26_1	Tr-type G domain-containing protein	GL50803_15101-t26_1	SAS-6_N domain-containing protein
GL50803_19003-t26_1	Ribosomal protein L24A	GL50803_15106-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_19436-t26_1	Ribosomal_L30 domain-containing protein	GL50803_15127-t26_1	Ribosomal protein L12
GL50803_2053-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase	GL50803_15148-t26_1	V-ATPase_H_C domain-containing protein
GL50803_2098-t26_1	ATP-dependent RNA helicase p54, putative	GL50803_15214-t26_1	PFK domain-containing protein
GL50803_2107-t26_1	hypothetical protein	GL50803_15215-t26_1	Ribosomal protein L26
GL50803_21118-t26_1	AMP-binding domain-containing protein	GL50803_15218-t26_1	ATP-dependent RNA helicase-like protein
GL50803_21423-t26_1	AP complex subunit beta	GL50803_15228-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_21505-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_15247-t26_1	tRNA_SAD domain-containing protein
GL50803_21628-t26_1	hypothetical protein	GL50803_15252-t26_1	L-serine dehydratase
GL50803_22165-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_15260-t26_1	Alpha-14 giardin
GL50803_22543-t26_1	hypothetical protein	GL50803_15310-t26_1	Alpha-17 giardin
GL50803_22850-t26_1	Mitogen-activated protein kinase	GL50803_15383-t26_1	Importin beta-3 subunit
GL50803_23833-t26_1	Vacuolar protein sorting 35	GL50803_15397-t26_1	2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase
GL50803_24279-t26_1	hypothetical protein	GL50803_15398-t26_1	Chaperone protein DnaJ
GL50803_24842-t26_1	Ankyrin repeat protein 1	GL50803_15409-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_26199-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_15410-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_27925-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_15411-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_28234-t26_1	Adenylate kinase	GL50803_15427-t26_1	Ribosomal protein S15A
GL50803_29327-t26_1	Vacuolar protein sorting 2	GL50803_15428-t26_1	Glucose regulated protein 94 / Heat shock protein 90
GL50803_29487-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_15460-t26_1	UBC core domain-containing protein
GL50803_29490-t26_1	VWFA domain-containing protein	GL50803_15472-t26_1	Ribosomal protein S15
GL50803_3206-t26_1	Pyruvate kinase	GL50803_15495-t26_1	WD40 repeat protein

GL50803_32778-t26_1	ANK REP REGION domain-containing protein	GL50803_15514-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_3331-t26_1	Malate dehydrogenase	GL50803_15520-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_33769-t26_1	NADH oxidase lateral transfer candidate	GL50803_15535-t26_1	Chaperone protein DnaJ
GL50803_33862-t26_1	Ribosomal L7Ae domain-containing protein	GL50803_15551-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_34093-t26_1	Ribosomal L38e	GL50803_15567-t26_1	ANK REP REGION domain-containing protein
GL50803_34684-t26_1	DEAD box RNA helicase Vasa	GL50803_15823-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_3593-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein	GL50803_15832-t26_1	Giardia trophozoite antigen GTA-2
GL50803_36069-t26_1	Ribosomal protein L34	GL50803_15869-t26_1	IFT81_CH domain-containing protein
GL50803_3643-t26_1	Peptidylprolyl isomerase	GL50803_15953-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_3861-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein	GL50803_15983-t26_1	Charged multivesicular body protein 1a
GL50803_39483-t26_1	Ribosomal protein S29A	GL50803_16034-t26_1	RRM domain-containing protein
GL50803_4079-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B	GL50803_16037-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_40817-t26_1	Actin	GL50803_16044-t26_1	Ribosomal protein L21
GL50803_41212-t26_1	hypothetical protein	GL50803_16086-t26_1	Deoxyhypusine synthase, putative
GL50803_4197-t26_1	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	GL50803_16114-t26_1	Ribosomal protein S18
GL50803_4266-t26_1	hypothetical protein	GL50803_16124-t26_1	Rab2a
GL50803_4410-t26_1	SALP-1	GL50803_16125-t26_1	1,4-alpha-glucan branching enzyme
GL50803_4547-t26_1	S4 RNA-binding domain-containing protein	GL50803_16161-t26_1	Aminoacyl-histidine dipeptidase
GL50803_4652-t26_1	Ribosomal protein S16	GL50803_16202-t26_1	GTP-binding nuclear protein
GL50803_4812-t26_1	Beta-giardin	GL50803_16235-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_5010-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase	GL50803_16265-t26_1	Prolyl-tRNA synthetase
GL50803_5188-t26_1	Ankyrin repeat protein 1	GL50803_16272-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5346-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_16298-t26_1	hypothetical protein
GL50803_5375-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_16310-t26_1	hypothetical protein
GL50803_5517-t26_1	Ribosomal protein L37a	GL50803_16311-t26_1	Ribosomal_L2_C domain-containing protein
GL50803_5593-t26_1	Ribosomal protein L11	GL50803_16312-t26_1	Ribosomal protein L36-1
GL50803_5649-t26_1	Alpha-10 giardin	GL50803_16328-t26_1	T-complex protein 1 subunit eta
GL50803_5659-t26_1	Methionine adenosyltransferase	GL50803_16368-t26_1	FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase
GL50803_5845-t26_1	40S ribosomal protein S8	GL50803_16376-t26_1	Kinesin-like protein
GL50803_5890-t26_1	hypothetical protein	GL50803_16387-t26_1	Axoneme central apparatus protein
GL50803_5942-t26_1	Polyadenylate-binding protein, putative	GL50803_16412-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5947-t26_1	Ribosomal protein L35a	GL50803_16424-t26_1	40S ribosomal protein S3a

GL50803_6022-t26_1	Ribosomal_S10 domain-containing protein	GL50803_16431-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_6133-t26_1	Ribosomal protein L35	GL50803_16443-t26_1	Ribosomal_S27 domain-containing protein
GL50803_6135-t26_1	Ribosomal protein S17	GL50803_16453-t26_1	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein
GL50803_6185-t26_1	AAA_28 domain-containing protein	GL50803_16504-t26_1	PUA domain-containing protein
GL50803_6283-t26_1	Helicase	GL50803_16521-t26_1	Hypothetical protein
GL50803_6430-t26_1	14_3_3 domain-containing protein	GL50803_16525-t26_1	PseudoU_synth_2 domain-containing protein
GL50803_6563-t26_1	UMP pyrophosphorylase	GL50803_16526-t26_1	Ribosomal protein L31B
GL50803_6633-t26_1	Farnesyl diphosphate synthase	GL50803_16549-t26_1	ATP-dependent RNA helicase p47, putative
GL50803_6687-t26_1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GL50803_16567-t26_1	60S ribosomal protein L18a
GL50803_7082-t26_1	40S ribosomal protein S21	GL50803_16568-t26_1	Heat-shock protein, putative
GL50803_7188-t26_1	hypothetical protein	GL50803_16588-t26_1	Disc-associated protein
GL50803_7195-t26_1	Glutamate synthase	GL50803_16612-t26_1	Ribosomal_L19e domain-containing protein
GL50803_7204-t26_1	RNA recognition motif family protein	GL50803_16636-t26_1	Protein phosphatase 2A B regulatory subunit Wdb1
GL50803_7244-t26_1	hypothetical protein	GL50803_16652-t26_1	Carbamate kinase
GL50803_7260-t26_1	Aldo_ket_red domain-containing protein	GL50803_16653-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7414-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_16667-t26_1	Alpha-snap
GL50803_7439-t26_1	Ser/Thr phosphatase 2A regulatory subunit A	GL50803_16745-t26_1	Ribosomal protein L3
GL50803_7532-t26_1	H(+)-transporting two-sector ATPase	GL50803_16760-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_7537-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_16766-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_7569-t26_1	GTP-binding protein Sar1	GL50803_16779-t26_1	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A
GL50803_7766-t26_1	40S ribosomal protein SA	GL50803_16795-t26_1	Putative Transcription factor
GL50803_7789-t26_1	ADP-ribosylation factor	GL50803_16802-t26_1	Ribosomal protein P2
GL50803_7796-t26_1	Alpha-2 giardin	GL50803_16804-t26_1	Tyrosine--tRNA ligase
GL50803_7799-t26_1	Alpha-4 giardin	GL50803_16824-t26_1	Rab2b
GL50803_7870-t26_1	Ribosomal_L23eN domain-containing protein	GL50803_16867-t26_1	Ribosomal_S13_N domain-containing protein
GL50803_7878-t26_1	Ribosomal protein S14	GL50803_16891-t26_1	FYVE-type domain-containing protein
GL50803_7999-t26_1	Ribosomal_S3_C domain-containing protein	GL50803_16894-t26_1	CoA_binding domain-containing protein
GL50803_8001-t26_1	Ribosomal protein L15	GL50803_16930-t26_1	Axoneme-associated protein GASP-180
GL50803_8037-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_16945-t26_1	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit
GL50803_8044-t26_1	Seven transmembrane protein 1	GL50803_16948-t26_1	Lysine--tRNA ligase
GL50803_8064-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_1695-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein
GL50803_8118-t26_1	S5 DRBM domain-containing protein	GL50803_16967-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_8174-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_17053-t26_1	Protein kinase domain-containing protein

GL50803_8445-t26_1	Kinase, NEK	GL50803_17054-t26_1	Dynein heavy chain
GL50803_8462-t26_1	60S ribosomal protein L27	GL50803_17055-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_8496-t26_1	Rac/Rho-like protein	GL50803_17056-t26_1	AAA family ATPase
GL50803_87519-t26_1	hypothetical protein	GL50803_17060-t26_1	LRRcap domain-containing protein
GL50803_86511-t26_1	CoA_binding domain-containing protein	GL50803_17063-t26_1	Metallophos domain-containing protein
GL50803_86676-t26_1	Delta giardin	GL50803_17068-t26_1	hypothetical protein
GL50803_8692-t26_1	hypothetical protein	GL50803_17090-t26_1	Kinesin-like protein
GL50803_8805-t26_1	Kinase, SCY1	GL50803_17105-t26_1	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein
GL50803_8822-t26_1	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)	GL50803_17106-t26_1	Rab11
GL50803_8826-t26_1	Glucokinase	GL50803_17121-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_88765-t26_1	Cytosolic HSP70	GL50803_17143-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_8903-t26_1	Copine domain-containing protein	GL50803_17149-t26_1	60S acidic ribosomal protein P0
GL50803_8917-t26_1	MHD domain-containing protein	GL50803_17150-t26_1	Spindle pole protein, putative
GL50803_8978-t26_1	Amylomaltase	GL50803_17153-t26_1	Ribosomal_L6 domain-containing protein
GL50803_9011-t26_1	Diadenosine tetraphosphate synthetase	GL50803_17190-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_9062-t26_1	Long chain fatty acid CoA ligase 5	GL50803_17199-t26_1	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase
GL50803_90710-t26_1	Vacuolar protein sorting 22	GL50803_17223-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_90872-t26_1	Phosphoglycerate kinase	GL50803_17224-t26_1	SAM domain-containing protein
GL50803_9183-t26_1	hypothetical protein	GL50803_17230-t26_1	IFT complex B
GL50803_91919-t26_1	CCT-alpha	GL50803_17231-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_93358-t26_1	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	GL50803_17243-t26_1	Bip
GL50803_9348-t26_1	Glutamine-tRNA synthetase	GL50803_17244-t26_1	Pyruvate kinase
GL50803_93938-t26_1	Triosephosphate isomerase	GL50803_17245-t26_1	G domain-containing protein
GL50803_9413-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_17254-t26_1	Flavodoxin_2 domain-containing protein
GL50803_94463-t26_1	hypothetical protein	GL50803_17255-t26_1	Alpha-11 giardin
GL50803_95192-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_17265-t26_1	eRF1_1 domain-containing protein
GL50803_9558-t26_1	Rab1a	GL50803_17304-t26_1	SAM_MT_RSMB_NOP domain-containing protein
GL50803_95593-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_17327-t26_1	IFT complex B
GL50803_9704-t26_1	TRANSKETOLASE_1 domain-containing protein	GL50803_17332-t26_1	Alpha-SNAP, putative
GL50803_9719-t26_1	Oxidored_FMN domain-containing protein	GL50803_17364-t26_1	Gamma giardin
GL50803_97219-t26_1	Fibrillarlin	GL50803_17395-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_9779-t26_1	PNP_UDP_1 domain-containing protein	GL50803_17400-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_98054-t26_1	HATPase_c domain-containing protein	GL50803_17411-t26_1	60S ribosomal protein L7a

GL50803_98056-t26_1	Ribosomal protein L17	GL50803_17413-t26_1	hypothetical protein
GL50803_9808-t26_1	Chaperone protein DnaJ	GL50803_17430-t26_1	Phosphoglucomutase
GL50803_9810-t26_1	Ribosomal protein L44	GL50803_17432-t26_1	hypothetical protein
GL50803_9825-t26_1	RuvB-like helicase	GL50803_17460-t26_1	Dynein heavy chain
GL50803_9848-t26_1	Dynein light chain	GL50803_17474-t26_1	Adaptin_N domain-containing protein
GL50803_9861-t26_1	hypothetical protein	GL50803_17482-t26_1	AMP_N domain-containing protein
GL50803_9909-t26_1	Pyruvate, phosphate dikinase	GL50803_17483-t26_1	hypothetical protein
		GL50803_17547-t26_1	40S ribosomal protein S26
		GL50803_17558-t26_1	Ribosomal_L18_c domain-containing protein
		GL50803_17563-t26_1	Cyclin
		GL50803_17565-t26_1	T-complex protein 1 subunit gamma
		GL50803_17566-t26_1	CDC19
		GL50803_17568-t26_1	FACT complex subunit
		GL50803_17570-t26_1	Heat shock protein 70
		GL50803_17578-t26_1	Tr-type G domain-containing protein
		GL50803_17625-t26_1	FHA domain-containing protein
		GL50803_19003-t26_1	T-complex protein 1 subunit delta
		GL50803_19436-t26_1	J domain-containing protein
		GL50803_1979-t26_1	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein
		GL50803_2053-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
		GL50803_2098-t26_1	Mitogen-activated protein kinase
		GL50803_2107-t26_1	RuvB-like helicase
		GL50803_21118-t26_1	Non-specific serine/threonine protein kinase
		GL50803_21331-t26_1	Protein 21.1
		GL50803_21423-t26_1	Tr-type G domain-containing protein
		GL50803_21474-t26_1	Kinase, NEK
		GL50803_21505-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
		GL50803_21628-t26_1	Ribosomal protein L24A
		GL50803_2198-t26_1	Ribosomal_L30 domain-containing protein
		GL50803_22165-t26_1	hypothetical protein
		GL50803_221692-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
		GL50803_22543-t26_1	ATP-dependent RNA helicase p54, putative
		GL50803_22629-t26_1	hypothetical protein
		GL50803_22677-t26_1	AMP-binding domain-containing protein

GL50803_22808-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_22850-t26_1	AP complex subunit beta
GL50803_23492-t26_1	hypothetical protein
GL50803_23602-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_23833-t26_1	hypothetical protein
GL50803_24279-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_24321-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_24372-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_24425-t26_1	hypothetical protein
GL50803_2452-t26_1	hypothetical protein
GL50803_24662-t26_1	Nitroreductase Fd-NR2
GL50803_2483-t26_1	AA_TRNA_LIGASE_II domain-containing protein
GL50803_24842-t26_1	Mitogen-activated protein kinase
GL50803_2562-t26_1	Protein 21.1
GL50803_26199-t26_1	3-phosphate/5-hydroxy nucleic acid ligase
GL50803_26364-t26_1	Vacuolar protein sorting 35
GL50803_27520-t26_1	hypothetical protein
GL50803_27925-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_28234-t26_1	AB hydrolase-1 domain-containing protein
GL50803_2876-t26_1	PPPDE domain-containing protein
GL50803_29307-t26_1	Ornithine cyclodeaminase
GL50803_29327-t26_1	L-serine dehydratase
GL50803_29487-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_2970-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_3007-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_3032-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_3042-t26_1	hypothetical protein
GL50803_3206-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_32697-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_32730-t26_1	Adenylate kinase
GL50803_32778-t26_1	UBC core domain-containing protein
GL50803_33166-t26_1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
GL50803_33218-t26_1	Vacuolar protein sorting 2
GL50803_3331-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein

GL50803_33685-t26_1	Tr-type G domain-containing protein
GL50803_33769-t26_1	hypothetical protein
GL50803_33862-t26_1	Tryptophanyl-tRNA synthetase
GL50803_34093-t26_1	Hybrid cluster protein
GL50803_34684-t26_1	Pyruvate kinase
GL50803_3531-t26_1	Methyltransferase domain-containing protein
GL50803_35428-t26_1	hypothetical protein
GL50803_3593-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_3595-t26_1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
GL50803_36069-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_3643-t26_1	Malate dehydrogenase
GL50803_3678-t26_1	hypothetical protein
GL50803_3861-t26_1	NADH oxidase lateral transfer candidate
GL50803_39483-t26_1	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein
GL50803_40067-t26_1	Ribosomal L38e
GL50803_4026-t26_1	DEAD box RNA helicase Vasa
GL50803_40496-t26_1	HZGJ
GL50803_4079-t26_1	Valyl-tRNA synthetase
GL50803_40817-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein
GL50803_41212-t26_1	Endonuclease III homolog
GL50803_4149-t26_1	Ribosomal protein L34
GL50803_4197-t26_1	Peptidylprolyl isomerase
GL50803_4236-t26_1	Vacuolar ATP synthase subunit D
GL50803_4266-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein
GL50803_4357-t26_1	Ribosomal protein S29A
GL50803_4365-t26_1	hypothetical protein
GL50803_4410-t26_1	Alpha-19 giardin
GL50803_4463-t26_1	Dynein heavy chain
GL50803_4547-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B
GL50803_4652-t26_1	Actin
GL50803_4812-t26_1	hypothetical protein
GL50803_4883-t26_1	Hom_end_hint domain-containing protein
GL50803_4912-t26_1	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
GL50803_5010-t26_1	Dynein light chain
GL50803_5171-t26_1	hypothetical protein
GL50803_5188-t26_1	Tyrosine-protein phosphatase domain-containing protein
GL50803_5328-t26_1	AAA domain-containing protein

GL50803_5346-t26_1	SALP-1
GL50803_5359-t26_1	Dynein light chain
GL50803_5375-t26_1	S4 RNA-binding domain-containing protein
GL50803_5517-t26_1	Ribosomal protein S16
GL50803_5593-t26_1	Beta-giardin
GL50803_5643-t26_1	hypothetical protein
GL50803_5649-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5659-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_5772-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_5795-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_5810-t26_1	AP complex subunit sigma
GL50803_5845-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5867-t26_1	Nop domain-containing protein
GL50803_5890-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5942-t26_1	Ribosomal protein L37a
GL50803_5947-t26_1	Ribosomal protein L11
GL50803_6022-t26_1	Kinase
GL50803_6120-t26_1	Alpha-10 giardin
GL50803_6133-t26_1	Methionine adenosyltransferase
GL50803_6135-t26_1	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase
GL50803_6171-t26_1	Leucine-rich repeat protein 1 virus receptor protein
GL50803_6184-t26_1	Putative_PNPOx domain-containing protein
GL50803_6185-t26_1	40S ribosomal protein S8
GL50803_6226-t26_1	CysteinyI-tRNA synthetase
GL50803_6283-t26_1	hypothetical protein
GL50803_6304-t26_1	Polyadenylate-binding protein, putative
GL50803_6430-t26_1	Ribosomal protein L35a
GL50803_6563-t26_1	Ribosomal_S10 domain-containing protein
GL50803_6633-t26_1	hypothetical protein
GL50803_6680-t26_1	Ribosomal protein L35
GL50803_6687-t26_1	Ribosomal protein S17
GL50803_6725-t26_1	hypothetical protein
GL50803_6939-t26_1	Branched-chain amino acid aminotransferase
GL50803_7082-t26_1	AAA_28 domain-containing protein
GL50803_7195-t26_1	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
GL50803_7204-t26_1	Helicase
GL50803_7233-t26_1	Fe-hydrogenase-1
GL50803_7244-t26_1	14_3_3 domain-containing protein
GL50803_7260-t26_1	UMP pyrophosphorylase

GL50803_7323-t26_1	Farnesyl diphosphate synthase
GL50803_7350-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_7375-t26_1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GL50803_7414-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7439-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_7522-t26_1	40S ribosomal protein S21
GL50803_7532-t26_1	Glutamate synthase
GL50803_7537-t26_1	RNA recognition motif family protein
GL50803_7569-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7588-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7662-t26_1	Aldo_ket_red domain-containing protein
GL50803_7766-t26_1	Vacuolar protein sorting 24
GL50803_7789-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7796-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_7799-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_7870-t26_1	Ser/Thr phosphatase 2A regulatory subunit A
GL50803_7878-t26_1	W2 domain-containing protein
GL50803_7950-t26_1	H(+)-transporting two-sector ATPase
GL50803_7953-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_7962-t26_1	GTP-binding protein Sar1
GL50803_7999-t26_1	SER_THR_PHOSPHATASE domain-containing protein
GL50803_8001-t26_1	RNase L inhibitor
GL50803_8003-t26_1	40S ribosomal protein SA
GL50803_8037-t26_1	ADP-ribosylation factor
GL50803_8064-t26_1	Alpha-2 giardin
GL50803_8118-t26_1	Alpha-4 giardin
GL50803_8163-t26_1	Ribosomal_L23eN domain-containing protein
GL50803_8174-t26_1	Ribosomal protein S14
GL50803_8189-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_8217-t26_1	ATPase ASNA1 homolog
GL50803_8348-t26_1	PROTEASOME_ALPHA_1 domain-containing protein
GL50803_8407-t26_1	Ribosomal_S3_C domain-containing protein
GL50803_8426-t26_1	Ribosomal protein L15
GL50803_8445-t26_1	Trafficking protein particle complex subunit
GL50803_8462-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_8496-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_8524-t26_1	S5 DRBM domain-containing protein

GL50803_8587-t26_1	Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase, putative
GL50803_8621-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_86444-t26_1	USP domain-containing protein
GL50803_86511-t26_1	PRK domain-containing protein
GL50803_86676-t26_1	hypothetical protein
GL50803_86681-t26_1	M20_dimer domain-containing protein
GL50803_86683-t26_1	Radial spokehead-like protein
GL50803_8682-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_8692-t26_1	60S ribosomal protein L27
GL50803_87202-t26_1	Rac/Rho-like protein
GL50803_8726-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_8745-t26_1	Kinase, AGC NDR
GL50803_87677-t26_1	Leucyl-tRNA synthetase
GL50803_8805-t26_1	Kinase, AGC PKA
GL50803_8822-t26_1	CoA_binding domain-containing protein
GL50803_88735-t26_1	Delta giardin
GL50803_88765-t26_1	Glutamyl-tRNA synthetase
GL50803_8916-t26_1	AAA domain-containing protein
GL50803_8917-t26_1	6-phosphogluconolactonase/Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
GL50803_8978-t26_1	hypothetical protein
GL50803_9008-t26_1	Protein F54C1.5
GL50803_9011-t26_1	Actin related protein
GL50803_9030-t26_1	hypothetical protein
GL50803_9038-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_90402-t26_1	Kinase, SCY1
GL50803_9058-t26_1	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)
GL50803_9062-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_90710-t26_1	Cytosolic HSP70
GL50803_90872-t26_1	Signal recognition particle
GL50803_9116-t26_1	MHD domain-containing protein
GL50803_9117-t26_1	Amylomaltase
GL50803_91220-t26_1	Aldo_ket_red domain-containing protein
GL50803_91643-t26_1	Diadenosine tetraphosphate synthetase
GL50803_9183-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_91919-t26_1	Nicotinate phosphoribosyltransferase
GL50803_9196-t26_1	Adenylate kinase

GL50803_92498-t26_1	TAP42-like family protein
GL50803_92741-t26_1	Long chain fatty acid CoA ligase 5
GL50803_93358-t26_1	Vacuolar protein sorting 22
GL50803_9348-t26_1	Phosphoglycerate kinase
GL50803_9349-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_93551-t26_1	cAMP-dependent protein kinase regulatory chain
GL50803_9376-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_93938-t26_1	26S proteasome regulatory subunit, putative
GL50803_9413-t26_1	hypothetical protein
GL50803_9421-t26_1	CCT-alpha
GL50803_94463-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_94582-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_94658-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_9485-t26_1	Aldehyde-alcohol dehydrogenase
GL50803_95064-t26_1	Glutamine-tRNA synthetase
GL50803_9508-t26_1	AMMECR1 domain-containing protein
GL50803_95192-t26_1	M16C-associated domain-containing protein
GL50803_9558-t26_1	Protein transport protein SEC23
GL50803_95593-t26_1	Triosephosphate isomerase
GL50803_9573-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_9593-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_96460-t26_1	hypothetical protein
GL50803_96670-t26_1	Ornithine decarboxylase
GL50803_9704-t26_1	UN_NPL4 domain-containing protein
GL50803_9719-t26_1	KH domain-containing protein
GL50803_97219-t26_1	Queuine tRNA-ribosyltransferase catalytic subunit 1
GL50803_9750-t26_1	M16C-associated domain-containing protein
GL50803_9779-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_9780-t26_1	Rab1a
GL50803_9803-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_98054-t26_1	hypothetical protein
GL50803_98056-t26_1	Coatomer beta subunit
GL50803_9808-t26_1	Alanine--tRNA ligase
GL50803_9810-t26_1	Cation_ATPase_N domain-containing protein
GL50803_9825-t26_1	TRANSKETOLASE_1 domain-containing protein

GL50803_9848-t26_1	Oxidored_FMN domain-containing protein
GL50803_9861-t26_1	Fibrillarin
GL50803_9894-t26_1	Intraflagellar transport protein IFT74/72
GL50803_9909-t26_1	PNP_UDP_1 domain-containing protein
	hypothetical protein
	HTH La-type RNA-binding domain-containing protein
	HATPase_c domain-containing protein
	Ribosomal protein L17
	Chaperone protein DnaJ
	Ribosomal protein L44
	RuvB-like helicase
	Dynein light chain
	hypothetical protein
	EF-hand domain-containing protein
	Pyruvate, phosphate dikinase

Protein_ID_hEV_1h	Protein_Name_hEV_1h	Protein_ID_hEV_24h	Protein_Name_hEV_24h
A0AAQ5BH53	Desmoplakin	A0AAQ5BH53	Desmoplakin
P63261	Actin, cytoplasmic 2	E7EQB2	Lactotransferrin
Q02413	Desmoglein-1	G3V1N2	Hemoglobin subunit alpha
Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein	P63261	Actin
Q6UWP8	Suprabasin	P01023	Alpha-2-macroglobulin
		P07355	Annexin A2
		P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein
		P25705	ATP synthase subunit alpha
		P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
		Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein
		Q6UWP8	Suprabasin

Protein_ID_intEV_1h	Protein_Name_intEV_1h	Protein_ID_intEV_24h	Protein_Name_intEV_24h
A0A7I2V3H3	Elongation factor 1-alpha	Q00610	Clathrin heavy chain 1
P20671	Histone H2A type 1-D	A0A7I2V3H3	Elongation factor 1-alpha
A0AA75LVZ2	Globin family profile domain-containing protein	P20671	Histone H2A type 1-D type 2-B
A8MW50	L-lactate dehydrogenase	A0A2R8Y6G6	phosphopyruvate hydratase
H3BQ34	Pyruvate kinase	A0AA75LVZ2	Globin family profile domain-containing protein
B0YIW2	Apolipoprotein C-III	A8MW50	L-lactate dehydrogenase
D6RD17	Immunoglobulin J chain	H3BQ34	Pyruvate kinase

E7EQB2	Lactotransferrin	B0YIW2	Apolipoprotein C-III
E9PFZ2	Ceruloplasmin	H0YFC6	GTP-binding nuclear protein Ran
G3V1N2	Hemoglobin subunit alpha	D6RD17	Immunoglobulin J chain
H7C5E8	Serotransferrin	E7EQB2	Lactotransferrin
P63261	Actin, cytoplasmic 2	E9PFZ2	Ceruloplasmin
O75106	Amine oxidase [copper-containing] 2	G3V1N2	Hemoglobin subunit alpha
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	H7C5E8	Serotransferrin
P01023	Alpha-2-macroglobulin	P63261	Actin, cytoplasmic 2
P02751	Fibronectin	J3KPS3	Fructose-bisphosphate aldolase
P07437	Tubulin beta chain	O75106	Amine oxidase [copper-containing] 2
P0DPH7	Tubulin alpha-3C chain	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	P01023	Alpha-2-macroglobulin
P35858	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	P02751	Fibronectin
P61626	Lysozyme C	P04350	Tubulin beta-4A chain
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P07355	Annexin A2
Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein	P07437	Tubulin beta chain
Q6UWP8	Suprabasin	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta
GL50803_101074-t26_1	VSP with INR	P0DPH7	Tubulin alpha-3C chain
GL50803_136021-t26_1	Tubulin beta chain	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein
GL50803_102101-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein	P13639	Elongation factor 2
GL50803_10255-t26_1	Putative Translation initiation factor eIF-4A	P48741	Putative heat shock 70 kDa protein 7
GL50803_10311-t26_1	Ornithine transcarbamylase	P23528	Cofilin-1
GL50803_103373-t26_1	Alpha-7.1 giardin	P35858	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
GL50803_103437-t26_1	Alpha-9 giardin	P61626	Lysozyme C
GL50803_103454-t26_1	High cysteine membrane protein Group 1	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
GL50803_112079-t26_1	Tubulin alpha chain	Q14764	Major vault protein
GL50803_103709-t26_1	BRO1 domain-containing protein	Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein
GL50803_3910-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	Q6UWP8	Suprabasin
GL50803_10428-t26_1	Ribosomal_L16 domain-containing protein	GL50803_10091-t26_1	Ribosomal protein L23
GL50803_11043-t26_1	Fructose-bisphosphate aldolase	GL50803_101074-t26_1	VSP with INR
GL50803_11118-t26_1	Phosphopyruvate hydratase	GL50803_101278-t26_1	hypothetical protein
GL50803_11129-t26_1	hypothetical protein   transcript_product	GL50803_136021-t26_1	Tubulin beta chain

GL50803_111936-t26_1	VSP	GL50803_101534-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_112103-t26_1	Arginine deiminase	GL50803_101906-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_112312-t26_1	Elongation factor 1-alpha	GL50803_102101-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein
GL50803_112801-t26_1	VSP	GL50803_102108-t26_1	Clathrin heavy chain
GL50803_112846-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein	GL50803_10255-t26_1	Putative Translation initiation factor eIF-4A
GL50803_113450-t26_1	VSP with INR	GL50803_10311-t26_1	Ornithine transcarbamylase
GL50803_113797-t26_1	VSP with INR	GL50803_103373-t26_1	Alpha-7.1 giardin
GL50803_114119-t26_1	Alpha-7.2 giardin	GL50803_103437-t26_1	Alpha-9 giardin
GL50803_114787-t26_1	Alpha-7.3 giardin	GL50803_103454-t26_1	High cysteine membrane protein Group 1
GL50803_11521-t26_1	VSP	GL50803_10367-t26_1	Ribosomal protein S24
GL50803_11654-t26_1	Alpha-1 giardin	GL50803_112079-t26_1	Tubulin alpha chain
GL50803_137612-t26_1	VSP	GL50803_103709-t26_1	BRO1 domain-containing protein
GL50803_137617-t26_1	VSP	GL50803_103713-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_137618-t26_1	VSP	GL50803_103944-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_13864-t26_1	Heat shock protein HSP 90-alpha	GL50803_3910-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_14373-t26_1	Dynamin	GL50803_10428-t26_1	Ribosomal_L16 domain-containing protein
GL50803_16076-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_10429-t26_1	CS domain-containing protein
GL50803_14551-t26_1	Alpha-6 giardin	GL50803_10521-t26_1	Arginyl-tRNA synthetase
GL50803_14586-t26_1	VSP with INR	GL50803_10623-t26_1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)
GL50803_15097-t26_1	Alpha-14 giardin	GL50803_10822-t26_1	WD-40 repeat protein family
GL50803_15409-t26_1	Protein kinase domain-containing protein	GL50803_10881-t26_1	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
GL50803_15972-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_10882-t26_1	hypothetical protein
GL50803_16453-t26_1	Carbamate kinase	GL50803_11043-t26_1	Fructose-bisphosphate aldolase
GL50803_16636-t26_1	Rab2b	GL50803_11118-t26_1	Phosphopyruvate hydratase
GL50803_1695-t26_1	Rab11	GL50803_11129-t26_1	hypothetical protein
GL50803_17060-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_111936-t26_1	VSP
GL50803_17121-t26_1	Bip	GL50803_112103-t26_1	Arginine deiminase
GL50803_17153-t26_1	Alpha-11 giardin	GL50803_112312-t26_1	Elongation factor 1-alpha
GL50803_2107-t26_1	hypothetical protein	GL50803_11247-t26_1	Ribosomal protein L13a
GL50803_24842-t26_1	Ankyrin repeat protein 1	GL50803_112681-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_27925-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein	GL50803_112801-t26_1	VSP
GL50803_3206-t26_1	Pyruvate kinase	GL50803_112828-t26_1	High cysteine membrane protein Group 4
GL50803_3331-t26_1	Malate dehydrogenase	GL50803_112846-t26_1	Kinesin motor domain-containing protein

GL50803_33769-t26_1	NADH oxidase lateral transfer candidate	GL50803_112885-t26_1	Pribosyltran domain-containing protein
GL50803_4652-t26_1	Ribosomal protein S16	GL50803_11301-t26_1	NDK domain-containing protein
GL50803_4812-t26_1	Beta-giardin	GL50803_113038-t26_1	Tenascin-like protein
GL50803_6430-t26_1	14_3_3 domain-containing protein	GL50803_11309-t26_1	EGF-like domain-containing protein
GL50803_6687-t26_1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GL50803_113450-t26_1	VSP with INR
GL50803_7244-t26_1	hypothetical protein	GL50803_114626-t26_1	High cysteine membrane protein EGF-like
GL50803_7796-t26_1	Alpha-2 giardin	GL50803_113553-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_7999-t26_1	Ribosomal_S3_C domain-containing protein	GL50803_11359-t26_1	40S ribosomal protein S4
GL50803_8001-t26_1	Ribosomal protein L15	GL50803_113656-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein
GL50803_8064-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_113797-t26_1	VSP with INR
GL50803_8118-t26_1	S5 DRBM domain-containing protein	GL50803_113892-t26_1	AMP-binding domain-containing protein
GL50803_88765-t26_1	Cytosolic HSP70	GL50803_114042-t26_1	High cysteine membrane protein Group 4
GL50803_90872-t26_1	Phosphoglycerate kinase	GL50803_114119-t26_1	Alpha-7.2 giardin
GL50803_93358-t26_1	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	GL50803_114210-t26_1	EGF-like domain-containing protein
GL50803_9413-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein	GL50803_114609-t26_1	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase
GL50803_9779-t26_1	PNP_UDP_1 domain-containing protein	GL50803_114671-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_9808-t26_1	Chaperone protein DnaJ	GL50803_114674-t26_1	VSP
GL50803_9909-t26_1	Pyruvate, phosphate dikinase	GL50803_11470-t26_1	VSP with INR
		GL50803_114776-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
		GL50803_114777-t26_1	MFS domain-containing protein
		GL50803_114787-t26_1	Alpha-7.3 giardin
		GL50803_11521-t26_1	VSP
		GL50803_11540-t26_1	MFS domain-containing protein
		GL50803_115831-t26_1	VSP
		GL50803_116477-t26_1	VSP
		GL50803_11654-t26_1	Alpha-1 giardin
		GL50803_11683-t26_1	Alpha-3 giardin
		GL50803_11950-t26_1	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein
		GL50803_12102-t26_1	Elongation factor 1-gamma
		GL50803_121046-t26_1	Histone domain-containing protein
		GL50803_12150-t26_1	Aminotran_1_2 domain-containing protein
		GL50803_12216-t26_1	Vacuolar ATP synthase subunit B

GL50803_12830-t26_1	hypothetical protein
GL50803_12981-t26_1	Ribosomal_S7 domain-containing protein
GL50803_13273-t26_1	Axonemal dynein light chain
GL50803_13350-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein
GL50803_1345-t26_1	Ribosomal protein L10a
GL50803_13500-t26_1	CCT-theta
GL50803_13561-t26_1	EF1_GNE domain-containing protein
GL50803_13584-t26_1	hypothetical protein
GL50803_136004-t26_1	VSP
GL50803_13608-t26_1	ATP-grasp domain-containing protein
GL50803_137612-t26_1	VSP
GL50803_137617-t26_1	VSP
GL50803_137618-t26_1	VSP
GL50803_137703-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_137713-t26_1	hypothetical protein
GL50803_137716-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_13864-t26_1	Heat shock protein HSP 90-alpha
GL50803_13921-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_13922-t26_1	hypothetical protein
GL50803_13998-t26_1	Threonyl-tRNA synthetase
GL50803_14019-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein
GL50803_14049-t26_1	Ribosomal protein L32
GL50803_14225-t26_1	CXC-rich protein
GL50803_14285-t26_1	Malate dehydrogenase
GL50803_14321-t26_1	Ribosomal_L7Ae domain-containing protein
GL50803_14329-t26_1	40S ribosomal protein S7
GL50803_14373-t26_1	Dynamin
GL50803_16076-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_14551-t26_1	Alpha-6 giardin
GL50803_14568-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_14586-t26_1	VSP with INR
GL50803_14620-t26_1	40S ribosomal protein S6
GL50803_14670-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein

GL50803_14699-t26_1	Ribosomal protein S23
GL50803_14827-t26_1	Ribosomal_S17_N domain-containing protein
GL50803_14859-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_14938-t26_1	Ribosomal protein L12
GL50803_14993-t26_1	PFK domain-containing protein
GL50803_15046-t26_1	Ribosomal protein L26
GL50803_15097-t26_1	Alpha-14 giardin
GL50803_15148-t26_1	Chaperone protein DnaJ
GL50803_15214-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_15228-t26_1	Ribosomal protein S15A
GL50803_41942-t26_1	High cysteine membrane protein Group 6
GL50803_15252-t26_1	UBC core domain-containing protein
GL50803_15260-t26_1	Ribosomal protein S15
GL50803_15383-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_15397-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_15409-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_15411-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_15427-t26_1	Giardia trophozoite antigen GTA-2
GL50803_15428-t26_1	IFT81_CH domain-containing protein
GL50803_15472-t26_1	Charged multivesicular body protein 1a
GL50803_15520-t26_1	Ribosomal protein L21
GL50803_15551-t26_1	Ribosomal protein S18
GL50803_15567-t26_1	Rab2a
GL50803_15832-t26_1	Aminoacyl-histidine dipeptidase
GL50803_15869-t26_1	GTP-binding nuclear protein
GL50803_15972-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_15983-t26_1	Prolyl-tRNA synthetase
GL50803_16086-t26_1	Ribosomal_L2_C domain-containing protein
GL50803_16114-t26_1	Ribosomal protein L36-1
GL50803_16124-t26_1	T-complex protein 1 subunit eta
GL50803_16125-t26_1	FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase
GL50803_16160-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein

GL50803_16235-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_16263-t26_1	Deflagellation inducible protein
GL50803_16265-t26_1	40S ribosomal protein S3a
GL50803_16310-t26_1	Ribosomal_L18e/L15P domain-containing protein
GL50803_16353-t26_1	hypothetical protein
GL50803_16368-t26_1	Ribosomal protein L31B
GL50803_16384-t26_1	hypothetical protein
GL50803_16387-t26_1	60S ribosomal protein L18a
GL50803_16412-t26_1	Heat-shock protein, putative
GL50803_16424-t26_1	Disc-associated protein
GL50803_16431-t26_1	Ribosomal_L19e domain-containing protein
GL50803_16453-t26_1	Carbamate kinase
GL50803_16504-t26_1	hypothetical protein
GL50803_16525-t26_1	Ribosomal protein L3
GL50803_16636-t26_1	Rab2b
GL50803_16652-t26_1	Ribosomal_S13_N domain-containing protein
GL50803_16653-t26_1	FYVE-type domain-containing protein
GL50803_16667-t26_1	CoA_binding domain-containing protein
GL50803_16745-t26_1	Axoneme-associated protein GASP-180
GL50803_16779-t26_1	Pept_C1 domain-containing protein
GL50803_16795-t26_1	Vesicle-fusing ATPase
GL50803_16802-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_16804-t26_1	Dynein heavy chain
GL50803_16824-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_16867-t26_1	AAA family ATPase
GL50803_16945-t26_1	Kinesin-like protein
GL50803_1695-t26_1	Rab11
GL50803_16967-t26_1	Kinase, NEK
GL50803_17053-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_17054-t26_1	60S acidic ribosomal protein P0
GL50803_17056-t26_1	Ribosomal_L6 domain-containing protein
GL50803_17060-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_17063-t26_1	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase

GL50803_17090-t26_1	SAM domain-containing protein
GL50803_17105-t26_1	IFT complex B
GL50803_17121-t26_1	Bip
GL50803_17143-t26_1	Pyruvate kinase
GL50803_17153-t26_1	Alpha-11 giardin
GL50803_17223-t26_1	IFT complex B
GL50803_17230-t26_1	Gamma giardin
GL50803_17244-t26_1	60S ribosomal protein L7a
GL50803_17249-t26_1	Coiled-coil protein
GL50803_17254-t26_1	Phosphoglucomutase
GL50803_17265-t26_1	Dynein heavy chain
GL50803_17364-t26_1	40S ribosomal protein S26
GL50803_17395-t26_1	Ribosomal_L18_c domain-containing protein
GL50803_17400-t26_1	Cyclin
GL50803_17483-t26_1	J domain-containing protein
GL50803_17547-t26_1	Ribos_L4_asso_C domain-containing protein
GL50803_17551-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_17566-t26_1	Non-specific serine/threonine protein kinase
GL50803_17568-t26_1	Protein 21.1
GL50803_17570-t26_1	Tr-type G domain-containing protein
GL50803_17625-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_19003-t26_1	Ribosomal protein L24A
GL50803_19436-t26_1	Ribosomal_L30 domain-containing protein
GL50803_2107-t26_1	hypothetical protein
GL50803_21118-t26_1	AMP-binding domain-containing protein
GL50803_21423-t26_1	AP complex subunit beta
GL50803_21505-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_21628-t26_1	hypothetical protein
GL50803_22165-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_22850-t26_1	Mitogen-activated protein kinase
GL50803_24842-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_24947-t26_1	Charged multivesicular body protein 1a
GL50803_25816-t26_1	High cysteine membrane protein Group 1

GL50803_27925-t26_1	ANK_REP_REGION domain-containing protein
GL50803_29327-t26_1	Vacuolar protein sorting 2
GL50803_29487-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_3042-t26_1	Hybrid cluster protein
GL50803_3206-t26_1	Pyruvate kinase
GL50803_33279-t26_1	VSP
GL50803_3331-t26_1	Malate dehydrogenase
GL50803_33769-t26_1	NADH oxidase lateral transfer candidate
GL50803_3593-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein
GL50803_36069-t26_1	Ribosomal protein L34
GL50803_3643-t26_1	Peptidylprolyl isomerase
GL50803_3861-t26_1	Fe-ADH domain-containing protein
GL50803_4026-t26_1	Alpha-19 giardin
GL50803_40817-t26_1	Actin
GL50803_41212-t26_1	hypothetical protein
GL50803_41472-t26_1	VSP
GL50803_4197-t26_1	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
GL50803_4410-t26_1	SALP-1
GL50803_4547-t26_1	S4 RNA-binding domain-containing protein
GL50803_4652-t26_1	Ribosomal protein S16
GL50803_4812-t26_1	Beta-giardin
GL50803_5010-t26_1	Serine/threonine-protein phosphatase
GL50803_5188-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_5346-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5375-t26_1	Protein kinase domain-containing protein
GL50803_5593-t26_1	Ribosomal protein L11
GL50803_5649-t26_1	Alpha-10 giardin
GL50803_5795-t26_1	Leucine-rich repeat protein 1 virus receptor protein
GL50803_5800-t26_1	START domain-containing protein
GL50803_5810-t26_1	Putative_PNPOx domain-containing protein
GL50803_5845-t26_1	40S ribosomal protein S8
GL50803_5942-t26_1	Polyadenylate-binding protein, putative
GL50803_5947-t26_1	Ribosomal protein L35a
GL50803_6022-t26_1	Ribosomal_S10 domain-containing protein

GL50803_6133-t26_1	Ribosomal protein L35
GL50803_6135-t26_1	Ribosomal protein S17
GL50803_6184-t26_1	Branched-chain amino acid aminotransferase
GL50803_6226-t26_1	Alpha-1,4 glucan phosphorylase
GL50803_6283-t26_1	Helicase
GL50803_6430-t26_1	14_3_3 domain-containing protein
GL50803_6563-t26_1	UMP pyrophosphorylase
GL50803_6633-t26_1	Farnesyl diphosphate synthase
GL50803_6687-t26_1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GL50803_6752-t26_1	Rhodanese domain-containing protein
GL50803_7082-t26_1	40S ribosomal protein S21
GL50803_7188-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7195-t26_1	Glutamate synthase
GL50803_7244-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7260-t26_1	Aldo_ket_red domain-containing protein
GL50803_7422-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7439-t26_1	Ser/Thr phosphatase 2A regulatory subunit A
GL50803_7532-t26_1	H(+)-transporting two-sector ATPase
GL50803_7569-t26_1	GTP-binding protein Sar1
GL50803_7662-t26_1	RNase L inhibitor
GL50803_7766-t26_1	40S ribosomal protein SA
GL50803_7789-t26_1	ADP-ribosylation factor
GL50803_7796-t26_1	Alpha-2 giardin
GL50803_7843-t26_1	hypothetical protein
GL50803_7870-t26_1	Ribosomal_L23eN domain-containing protein
GL50803_7878-t26_1	Ribosomal protein S14
GL50803_7999-t26_1	Ribosomal_S3_C domain-containing protein
GL50803_8001-t26_1	Ribosomal protein L15
GL50803_8044-t26_1	Seven transmembrane protein 1
GL50803_8064-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_8118-t26_1	S5 DRBM domain-containing protein
GL50803_8407-t26_1	M20_dimer domain-containing protein
GL50803_8462-t26_1	60S ribosomal protein L27
GL50803_8496-t26_1	Rac/Rho-like protein

GL50803_87519-t26_1	hypothetical protein
GL50803_86511-t26_1	CoA_binding domain-containing protein
GL50803_86676-t26_1	Delta giardin
GL50803_8682-t26_1	6-phosphogluconolactonase/Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
GL50803_8822-t26_1	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)
GL50803_8826-t26_1	Glucokinase
GL50803_88765-t26_1	Cytosolic HSP70
GL50803_8903-t26_1	Copine domain-containing protein
GL50803_9030-t26_1	Ankyrin repeat protein 1
GL50803_9062-t26_1	Long chain fatty acid CoA ligase 5
GL50803_90710-t26_1	Vacuolar protein sorting 22
GL50803_90872-t26_1	Phosphoglycerate kinase
GL50803_9183-t26_1	hypothetical protein
GL50803_93358-t26_1	Aldehyde-alcohol dehydrogenase
GL50803_93938-t26_1	Triosephosphate isomerase
GL50803_9413-t26_1	Thioredoxin domain-containing protein
GL50803_9558-t26_1	Rab1a
GL50803_95593-t26_1	Protein kinase
GL50803_9704-t26_1	TRANSKETOLASE_1
GL50803_9719-t26_1	Oxidored_FMN
GL50803_9779-t26_1	PNP_UDP_1
GL50803_98054-t26_1	HATPase_c
GL50803_9808-t26_1	Chaperone protein DnaJ
GL50803_9810-t26_1	Ribosomal protein L44
GL50803_9825-t26_1	RuvB-like helicase
GL50803_9827-t26_1	Thioredoxin reductase
GL50803_9848-t26_1	Dynein light chain
GL50803_9861-t26_1	hypothetical protein
GL50803_9909-t26_1	Pyruvate, phosphate dikinase