

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

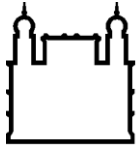
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE MICROVESICULAÇÃO DE
TROFOZOÍTOS DE *Giardia intestinalis* E DETERMINAÇÃO DO PAPEL DAS
MICROVESÍCULAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS HOSPEDEIRAS**

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Rio de Janeiro

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

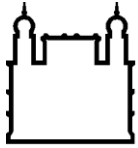
CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE MICROVESICULAÇÃO DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia intestinalis* E DETERMINAÇÃO DO PAPEL DAS MICROVESÍCULAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Marcel Iván Ramírez Araya

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE MICROVESICULAÇÃO DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia intestinalis* E DETERMINAÇÃO DO PAPEL DAS MICROVESÍCULAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS HOSPEDEIRAS.

ORIENTADOR: Dr. Marcel Iván Ramírez Araya

Aprovada em: 29/08/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar - **Presidente**

Prof. Dr. Katia da Silva Calabrese (FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Rossiane Claudia Vommaro (UFRJ)

Prof. Dra. Mariana Caldas Waghbi (Suplente/FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Yara Traub Czeko (Suplente/FIOCRUZ/RJ)

Rio de Janeiro, 29 de agosto de 2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maricel Le Quesne Ott e Nicolás Iván Mojoli Chiesa, e irmãs Antonella e Paola. Meu amor e agradecimentos para vocês.

Às minhas queridíssimas Perla, Yolanda Mojoli e Blanca Naviliat pelo apoio e confiança dados para mim durante anos.

Às Dras. Antonieta Rojas de Arias, Miriam Rolon e Celeste Vega. Apesar da distância, o constante e estreito acompanhamento e apoio de vocês durante estes dois anos permitiram atingir meus objetivos.

À Dra. Poliana Deolindo quem com sua eterna amabilidade e vocação de ensino se constituiu num modelo para meu futuro profissional.

Ao Dr. Marcel Ramirez pela confiança de abrir as portas do seu grupo de pesquisa para mim.

À Dra. Leila Mendonça Lima pelo apoio e inúmeras sugestões dadas para mim com imensa paciência.

A minha revisora de dissertação, a Dra. Mariana Caldas Waghabi, obrigado pelas valiosas correções e o perfeccionismo acompanhado sempre de uma grande gentileza.

Aos amigos Bruno, Marina, Tatiana, Andrea, Marcia e Erich pelo apoio e amizade, vocês foram minha segunda família aqui no Brasil.

A Aliny e Fernanda pelo amável apoio durante o mestrado.

A Tatiane pela sabedoria de vida compartilhada comigo e Dona Mariza pela amabilidade somente comparável com um familiar.

À Dra. Alba Segovia por me iniciar no ambiente da pesquisa científica, sem as suas orientações provavelmente eu estaria ainda sem um norte definido.

Por último, meus maiores agradecimentos ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e ao Brasil pela imensa e valiosa oportunidade dada para mim.

“Uma época ou uma cultura caracteriza-se mais pela natureza das questões que coloca do que pela extensão de seus conhecimentos”

François Jacob.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetronitrila

ADI: arginina deiminase

CWP: Proteínas da parede cística.

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético.

EGTA: Ácido etilenoglicoltetraacético

ELISA: *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*.

VEs: Vesículas extracelulares.

FA: Ácido fórmico

FACs: *Fluorescence-activated cell sorting*.

FCS: *Forward Scatter*.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

Gln6PI: glucosamina-6-fosfato isomerase

mRNA: RNA mensageiro.

miRNA: micro RNA.

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium.

MVs: Microvesículas

MVBs: Corpos multivesiculares.

OCT: ornitina carbamoiltransferase.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

ORF: *Open reading frame*

PBS: Tampão fosfato salino.

PE: Fosfatidiletanolamina.

pH: Potencial de hidrogênio.

PS: fosfatidilserina.

RNA: Ácido ribonucleico.

SSC: *Side Scatter*.

TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA

TFA: ácido trifluoroacético

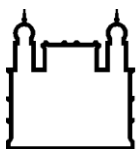
VSP: proteínas variáveis de superfície.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Mecanismos fisiopatológicos propostos para a giardíase	25
Tabela 1.2. Principais fatores de virulência de <i>Giardia</i> spp.	26
Tabela 1.3. Principais características das vesículas extracelulares	29
Tabela 1.4. Doenças infecciosas nas quais as vesículas extracelulares liberadas por protozoários desempenham um papel no desenvolvimento da patogênese.	36
Tabela 4.1. Análise qualitativa das proteínas presentes nas microvesículas de <i>G. intestinalis</i>	53
Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos	83
Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após indução a encistamento	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais características do trofozoíto e do cisto de <i>Giardia</i> spp	18
Figura 1.2. Ciclo biológico de <i>G. intestinalis</i> no homem	21
Figura 1.3. Estimativa de risco de infecção por <i>G. intestinalis</i> em viajantes retornando à Suécia	23
Figura 1.4. Representação esquemática de vesículas extracelulares	27
Figura 1.5. Faixas de tamanho dos principais tipos de vesículas de membrana	28
Figura 1.6. Liberação de microvesículas e exossomos	32
Figura 1.7. Formação e composição de uma microvesícula típica.	33
Figura 1.8. Interações de vesículas extracelulares com as células-alvo	35
Figura 1.9. Exemplos do papel das vesículas extracelulares liberadas por parasitas na interação patógeno/hospedeiro	37
Figura 4.1. Análise por citometria de fluxo das microvesículas de <i>G. intestinalis</i> .	48
Figura 4.2. A extração do colesterol de membrana diminui a produção de microvesículas	50
Figura 4.3. Gel de agarose a 1,5% com amostras de RNA de trofozoítos íntegros e de MVs isoladas	51
Figura 4.4. Cinética da produção de microvesículas por trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	52
Figura 4.5. Crescimento de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> e produção de microvesículas em meios com diferentes pH.	55
Figura 4.6. Interação de vesículas extracelulares de <i>G. intestinalis</i> com a membrana de células Caco-2.	57
Figura 4.7. Efeito das microvesículas de <i>G. intestinalis</i> na proliferação celular.	58
Figura 4.8. Adesão de trofozoítos à células hospedeiras na presença de vesículas extracelulares.	60
Figura 4.9. Trofozoítos tratados com M β CD e presentes no sobrenadante	62



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização dos mecanismos de microvesiculação de trofozoítos de *Giardia intestinalis* e determinação do papel das microvesículas na interação com células hospedeiras.

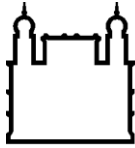
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Giardia intestinalis (*G. intestinalis*) é o parasita gastrointestinal mais comum que coloniza o trato intestinal humano onde permanece extracelular e aderido às células intestinais. O parasita tem uma distribuição mundial, causando um número estimado de 2.8×10^8 casos por ano e recentemente a doença foi incluída como parte da Iniciativa das Doenças Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde. As manifestações clínicas da giardíase são variáveis, e vão desde a ausência de sintomas até diarreias agudas ou crônicas. Adicionalmente, estudos recentes indicam que distúrbios gastrintestinais funcionais, tais como a síndrome do intestino irritável, e o déficit de crescimento em crianças podem ser associados com a infecção por *G. intestinalis*. Apesar da alta prevalência e das consequências desta doença, os mecanismos fisiopatológicos subjacentes na giardíase ainda permanecem incompreendidos. Os trofozoítos causam a doença sem penetrar no epitélio intestinal, nem entrar na corrente sanguínea e sem secretar nenhuma toxina conhecida. Nos últimos anos, tem sido descrito que as vesículas extracelulares podem participar na interação parasita-célula hospedeira. As vesículas extracelulares podem ser: microvesículas (MVs) e derivadas da membrana plasmática; exossomos, pequenas vesículas originadas a partir de membranas de endossomos; e corpos apoptóticos contendo material do núcleo celular. As MVs têm sido mostradas como importantes fatores na interação parasita-célula hospedeira. No presente trabalho, foi utilizada uma combinação de metodologias, incluindo citometria de fluxo, microscopia de fluorescência, proliferação celular, análises de proteoma e ensaios de aderência celular para investigar o papel das microvesículas liberadas por trofozoítos de *G. intestinalis* nas propriedades patogênicas deste parasita. Demonstramos que *G. intestinalis* produz e secreta microvesículas com exposição superficial de fosfatidilserina. Além disso, o processo de liberação de MVs é dependente do tempo e da concentração de cálcio, envolve microdomínios de membrana e as microvesículas contêm RNA de baixo peso molecular. Observamos também que os microdomínios de membrana estão envolvidos na adesão do parasita à células Caco-2. Nossa análise proteômica preliminar sugere presença de componentes do citoesqueleto, alfa giardinas, enzimas metabólicas e proteínas variáveis de

superfície (VSP) nas MVs isoladas de *G. intestinalis*. Foi demonstrado também que as MVs de *G. intestinalis* interagem com as células do hospedeiro aumentando a proliferação destas e incrementado também o número de trofozóitos aderidas à estas células. O presente estudo é o primeiro a sugerir um papel potencial para as microvesículas de *G. intestinalis* na colonização do hospedeiro. Uma melhor compreensão do papel das MVs liberadas pelo parasita na interação com a célula hospedeira poderá fornecer novas perspectivas sobre patogênese e possivelmente novas ferramentas para o diagnóstico e a terapia da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of microvesiculation mechanisms of *Giardia intestinalis* trophozoites and determination of the microvesicles role in the interaction with host cells.

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

ANDRES HERNAN MOJOLI LE QUESNE

Giardia intestinalis (*G. intestinalis*) is the most common gastrointestinal parasite that colonizes the human intestinal tract where it remains extracellular and adheres to intestinal cells. The parasite has a global distribution causing an estimated 2.8×10^8 cases per year and the illness was recently included in the World Health Organization Neglected Disease Initiative. Clinical manifestations of giardiasis are quite variable, and range from the absence of symptoms to acute or chronic diarrhea. Additionally, recent studies indicate that functional gastrointestinal disorders, such as irritable bowel syndrome, and failure of children to thrive can be associated with *G. intestinalis* infection. Even though the high prevalence and consequences of this disease, pathophysiological mechanisms underlying symptomatic giardiasis remain incompletely understood. Trophozoites cause disease without penetrating the intestinal epithelium, entering the bloodstream or secreting toxins. In recent years it has been described that extracellular vesicles could participate in parasite-host cell interaction. The extracellular vesicles may be: microvesicles (MVs) and derived from the plasma membrane; exosomes, small vesicles originated from endosomal limiting membrane; and apoptotic bodies containing nuclear material. MVs have been shown to be important factors in the parasite-host cell interaction. Here, we used a combination of methodologies including flow cytometry, fluorescence microscopy, cell proliferation, proteomics analysis and cell adherence assays to investigate the role of released microvesicles from *G. intestinalis* trophozoites on the pathogenic properties of this parasite. We have found that *G. intestinalis* produces and secretes microvesicles with superficial exposition of phosphatidilserine. Additionally, the shedding process was calcium and time-dependent, involves membrane microdomains and the microvesicles contain low-molecular weight RNA. We also observed that membrane microdomains are involved in parasite attachment to Caco-2 cells. Our preliminary proteomic analysis suggested the presence of cytoskeleton components, alpha giardins, metabolic enzymes and variant-specific surface protein (VSP) in the isolated MVs from *G. intestinalis*. We demonstrate that *G. intestinalis* microvesicles interact with host cells

increasing their proliferation and augmenting the number of trophozoites adhered to these cells. The present study is the first to suggest a potential role for *G. intestinalis* microvesicles in host cell colonization. A better understanding of the role of the released microvesicles by the parasite on the host-cell interaction will provide insights into pathogenesis and possibly new tools for diagnosis and therapy.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. <i>Giardia</i> spp.	16
1.2. Histórico.....	16
1.3. Biologia celular e molecular de <i>Giardia</i> spp.	17
1.4. Ciclo biológico de <i>G. intestinalis</i>	20
1.5. Epidemiologia e transmissão da giardíase.	22
1.6. Diagnóstico.	24
1.7. Fisiopatologia da giardíase.....	24
1.8. Vesículas extracelulares.	27
1.10. Métodos de isolamento e caracterização das vesículas extracelulares.....	29
1.11. Biogênese e liberação de vesículas extracelulares.	30
1.12. Composição de vesículas extracelulares.	32
1.13. Interação das vesículas extracelulares com a célula-alvo.	34
1.14. Papel das VEs em doenças infecciosas.	36
II. OBJETIVOS	39
III. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. Culturas celulares	40
3.2. Encistamento in vitro.	40
3.3. Obtenção e quantificação de microvesículas	41
3.4. Marcação de MVs com Anexina-V-FITC.....	42
3.5. Depleção de colesterol	42
3.6. Extração de RNA das MVs.	42
3.7. Análise proteômica das MVs de <i>G. intestinalis</i>	43
3.8. Ensaios de interação MVs-células hospedeiras.....	44
3.9. Avaliação da proliferação celular.....	45
3.10. Ensaios de adesão.....	45
3.11. Análise estatística.....	46
IV. RESULTADOS.....	47
4.1. As MVs de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> apresentam PS na superfície e são liberadas de modo dependente de cálcio.	47
4.2. A manutenção da estrutura da membrana plasmática é importante para a produção de MVs pelos trofozoítos	49

4.3. O crescimento dos trofozoítos e a liberação de MVs são dependentes do pH do meio.....	50
4.4. Cinética da produção de MVs por trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	51
4.5. Análise proteômica preliminar das MVs de <i>G. intestinalis</i>	53
4.6. As MVs de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> carregam ácidos ribonucleicos.	55
4.7. MVs de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i> interagem com as células Caco-2.....	56
4.8. As MVs de <i>G. intestinalis</i> modulam a proliferação de células Caco-2	57
4.9. As MVs de <i>G. intestinalis</i> aumentam o número de trofozoítos aderidos às células hospedeiras.	59
4.10. A extração do colesterol da membrana plasmática dos trofozoítos reduz o número de parasitas aderidos às células Caco-2.	61
V. DISCUSSÃO	63
VI. CONCLUSÕES	72
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
VIII. ANEXOS.....	82

I. INTRODUÇÃO

1.1. *Giardia spp.*

O gênero *Giardia* é composto por parasitos intestinais de um amplo espectro de hospedeiros, mas somente a *G. intestinalis* infecta hospedeiros mamíferos (1).

Giardia é um protozoário do filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida e família Hexametidae. São flagelados binucleados encontrados em ambientes anaeróbios ou em microaerofilia. Atualmente são classificados como parte do supergrupo Excavata (2)

G. intestinalis (sinonímia: *G. lamblia* e *G. duodenalis*) infecta a maioria dos mamíferos, incluindo animais de companhia, silvestres e o homem. O parasita é o agente etiológico da giardíase, uma das principais doenças contribuintes para o enorme número de padecimentos diarreicos em humanos. Estes encontram-se como segundo lugar entre causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo após as infecções respiratórias (3).

Estudos genéticos dos isolados de *G. intestinalis* recuperados de humanos infectados mostram que estes parasitos se dividem em dois principais grupos genéticos ou *assemblages*, chamados A e B (4). Esses dois grupos são encontrados também em outros animais como gado, gatos, cães e ratos.

1.2. *Histórico.*

O parasita *Giardia* foi descrito pela primeira vez por Antony van Leeuwenhoek em 1681 (5,6). Posteriormente em 1859, o parasita foi descrito com maiores detalhes por Vilem Dusan Lambl, quem determinou que este organismo pertencia ao gênero *Cercomonas* e o nomeou *Cercomonas intestinalis* (1). Em 1879, Grassi nomeou um organismo em roedores, agora conhecido como sendo uma espécie de *Giardia*, de *Dimorphus muris*, aparentemente sem saber da descrição já feita por Lambl. Foi apenas na década de 1880 que a forma de cisto foi associada a este flagelado (3). Kunstler em 1882 utilizou pela primeira vez o termo genérico *Giardia* quando descreveu o flagelado no intestino de um girino. Em 1888, Blanchard sugeriu *Lambliia intestinalis* (7), que Stiles (1902) trocou para *Giardia duodenalis*

(8). Posteriormente, Kofoid e Christiansen propuseram os nomes *G. lamblia* em 1915 (9) e *G. enterica* em 1920 (10). Em 1952, Filice publicou uma detalhada descrição morfológica da *Giardia* propondo três nomes para espécie: *G. duodenalis*, *G. muris* e *G. agilis* (11).

O nome da espécie *G. lamblia* tornou-se amplamente aceito até os anos 1970. Desde os anos 1980, alguns têm incentivado o uso do nome de *G. duodenalis*, e a partir da década de 1990, o nome de *G. intestinalis* tem sido mais usado (1).

1.3. Biologia celular e molecular de *Giardia* spp.

Giardia é um organismo eucariótico com núcleo diferenciado, citoesqueleto e sistema de endomembranas. No entanto, não possui algumas organelas que são comuns aos eucariotos. Diferentemente de outros eucariotos, que metabolizam os carboidratos de forma aeróbica, as espécies de *Giardia*, *Trichomonas* e *Entamoeba* utilizam o metabolismo fermentativo (inclusive na presença de oxigênio) para obtenção de energia. A geração de ATP através da via glicolítica depende apenas da fosforilação oxidativa ao nível de substrato. Em *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) as enzimas envolvidas no metabolismo energético encontram-se no citoplasma e numa organela denominada hidrogenossoma. No entanto, *Giardia* não apresenta uma compartimentalização metabólica e todas as reações ocorrem no citosol ou sobre as superfícies de membrana em contato com o citosol. Este parasita também utiliza a via de arginina dehidrolase para a produção de energia. Nesta via, o aminoácido arginina é convertido em ornitina e amoníaco com a geração de ATP a partir de ADP(3).

Giardia tem sido considerado um fóssil vivente devido ao sistema de endomembranas pouco desenvolvido, carência de íntrons e aparente ausência de mitocôndrias. Isto reforçou a ideia de que as espécies de *Giardia* tenham divergido antes da aquisição dessas organelas. No entanto, Tovar e colaboradores (2003) descreveram os mitossomas como remanescentes mitocondriais que retêm algumas funções na síntese de grupos ferro-enxofre em *G. intestinalis* (12), sugerindo que o parasita não seria um organismo originalmente sem mitocôndrias. Ao contrário o mitossoma seria uma organela derivada do processo endossimbiótico de aquisição de mitocôndrias.

O número de mitossomas varia entre 25 a 100 por célula e dois tipos desta organela foram descritos em *Giardia* spp (13): os mitossomas periféricos que estão distribuídos por todo o citoplasma, e os mitossomas centrais encontrados na região próxima dos corpos basais entre os núcleos (Figura 1.1A).

O estágio vegetativo e proliferativo do parasita, ou trofozoíto, tem formato piriforme (Figuras 1.1. A, C), mede aproximadamente 12 a 15 µm de comprimento, 5 a 9 µm de largura e 1 a 2 µm de espessura.

No citoplasma encontram-se ribossomos, grânulos de glicogênio e as vesículas periféricas que são vesículas de tipo lisossomo localizadas próximas da membrana plasmática por toda a célula. Adicionalmente, o citoesqueleto inclui quatro pares de flagelos, um disco ventral rígido composto de microtúbulos e o corpo mediano que consiste em uma estrutura microtubular de função desconhecida.

O disco ventral é exclusivo do gênero *Giardia*. Está envolvido na fixação do parasito ao intestino que depende do metabolismo ativo do microorganismo podendo ser inibida com temperaturas menores que 37°C, elevados níveis de oxigênio ou concentrações reduzidas de cisteína (1). Em imagens de ultraestrutura o disco ventral aparece como uma estrutura côncava que cobre toda a superfície ventral do trofozoíto. Também contém tubulinas, proteínas contrácteis e proteínas ácidas denominadas giardinas. Estas proteínas compreendem cerca de 20% das proteínas do citoesqueleto e são específicas das espécies de giardia (3).

Outro grupo importante de proteínas de *G. intestinalis* são as proteínas variáveis específicas de superfície (VSP) que cobrem a totalidade da superfície dos trofozoítos, incluindo o disco ventral e os flagelos, e são os principais antígenos reconhecidos pelo hospedeiro humano (14). As VSPs variam espontaneamente aproximadamente a cada 6-13 gerações (15). Este processo, conhecido como variação antigênica, permite ao parasita realizar a mudança contínua de proteínas de superfície altamente antigênicas, e como consequência permite a evasão da resposta imune do hospedeiro (16).

Os trofozoítos possuem dois núcleos localizados anteriormente e simétricos em relação ao eixo longitudinal. Ambos são ativos para a transcrição gênica (2). Durante a mitose, os dois núcleos diplóides replicam-se aproximadamente ao mesmo tempo e formam

quatro núcleos diplóides, que são repartidos de forma equitativa no processo de divisão celular (17).

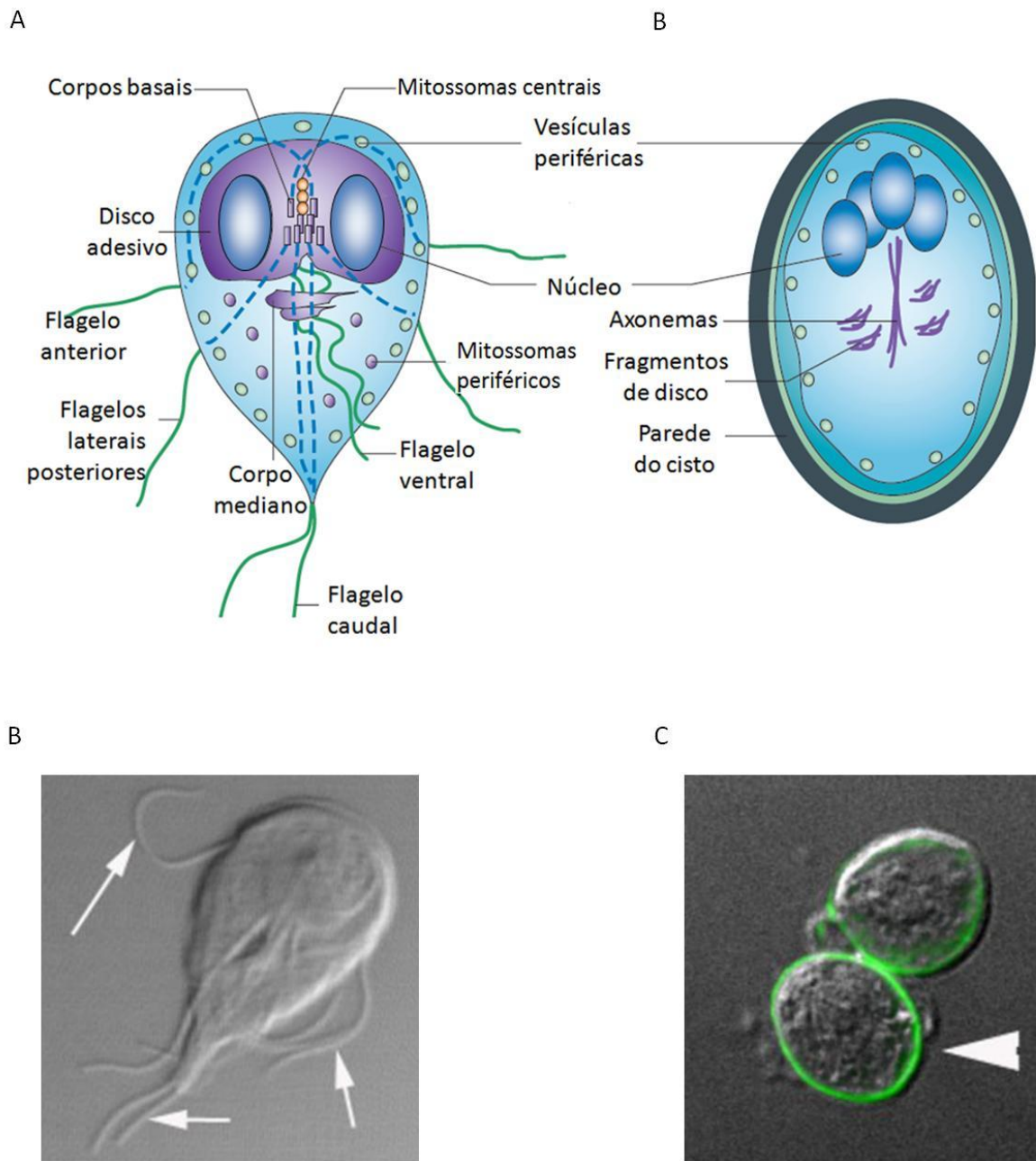


Figura 1.1. Principais características do trofozoíto e do cisto de *Giardia* spp. A | Forma trofozoítica; B | forma cística. Estruturas morfológicas estão indicadas com seus respectivos nomes. Linhas tracejadas indicam estruturas internas dos flagelos que se originam dos corpos basais; C | Imagem de microscopia de contraste por interferência diferencial de um trofozoíto. As setas indicam os flagelos; D | Imagem de contraste de imunofluorescência e por interferência diferencial de cistos de *G. intestinalis*. A proteína da parede do cisto 1 (CWP1) é mostrada em verde (cabeça da seta). (A e B modificadas de Ankarklev J, 2010; C e D, adaptadas de Rópolo, A. 2010).

Em 2007 foi sequenciado o genoma da cepa WB de *G. intestinalis*. Este possui aproximadamente 11,7 megabases de tamanho com 6470 ORFs e encontra-se distribuído em cinco cromossomos lineares com telômeros nos extremos que apresentam similaridade de sequência às de outros eucariontes (2). Como em outros eucariotos, o DNA dos cromossomos de *Giardia* encontra-se associado com histonas formando nucleossomas (1).

Outra forma evolutiva é o cisto (Figuras 1.1. B, D) que apresenta forma oval e possui 8-12 µm de comprimento por 7-10 µm de largura. A parede exterior do cisto é dupla com 0,3-0,5 µm de espessura e é composta de uma rede de filamentos que variam de 7 a 20 nm de diâmetro. Esta parede é composta principalmente de N-acetilgalactosamina e três proteínas diferentes de parede: CWP1, CWP2 e CWP3 (18). O cisto possui quatro núcleos tetraploides. Nesta forma evolutiva o disco adesivo e os flagelos são internalizados pelo parasita. Os cistos possuem um metabolismo basal, podendo sobreviver em uma grande variedade de ambientes, sendo as formas infectantes do parasita (2).

1.4. Ciclo biológico de G. intestinalis.

O ciclo de vida do parasita (monoxeno) apresenta duas formas evolutivas diferentes: uma fase proliferativa não infectante – trofozoíto - e uma fase infectante e não proliferativa – cisto (17).

O cisto inicia a infecção através da via oro-fecal, da ingestão de água e alimentos contaminados por esta forma evolutiva e de forma direta pessoa-a-pessoa.

A exposição dos cistos ao ácido gástrico durante a sua passagem através do estômago (Figura 1.2 A-2) provoca o excistamento (Figura 1.2 B). Neste processo de um único cisto há

formação de dois trofozoítos binucleados que aderem e colonizam especificamente o intestino delgado (Figura 1.2 A-3) (3). Os trofozoítos replicam-se (Figura 1.2. B) e utilizam os seus quatro pares de flagelos para se locomoverem no fluido do lúmen, e podem persistir no intestino delgado por semanas ou até mesmo por anos (17). No entanto, se os trofozoítos são transportados pelo fluxo do fluido intestinal então o encistamento ocorre e ao final deste processo a mobilidade desaparece (3), a porção externa fica arredondada e filamentosa, o disco adesivo e os flagelos são desmontados e são armazenados na forma de fragmentos no cisto (19). Os cistos são eliminados pelas fezes em uma a duas semanas após a infecção inicial, já apresentando capacidade infectiva, podendo contaminar água e alimentos (Figura 1.2 A-5). Em humanos, a dose infectante é cerca de 10 a 100 cistos (20).

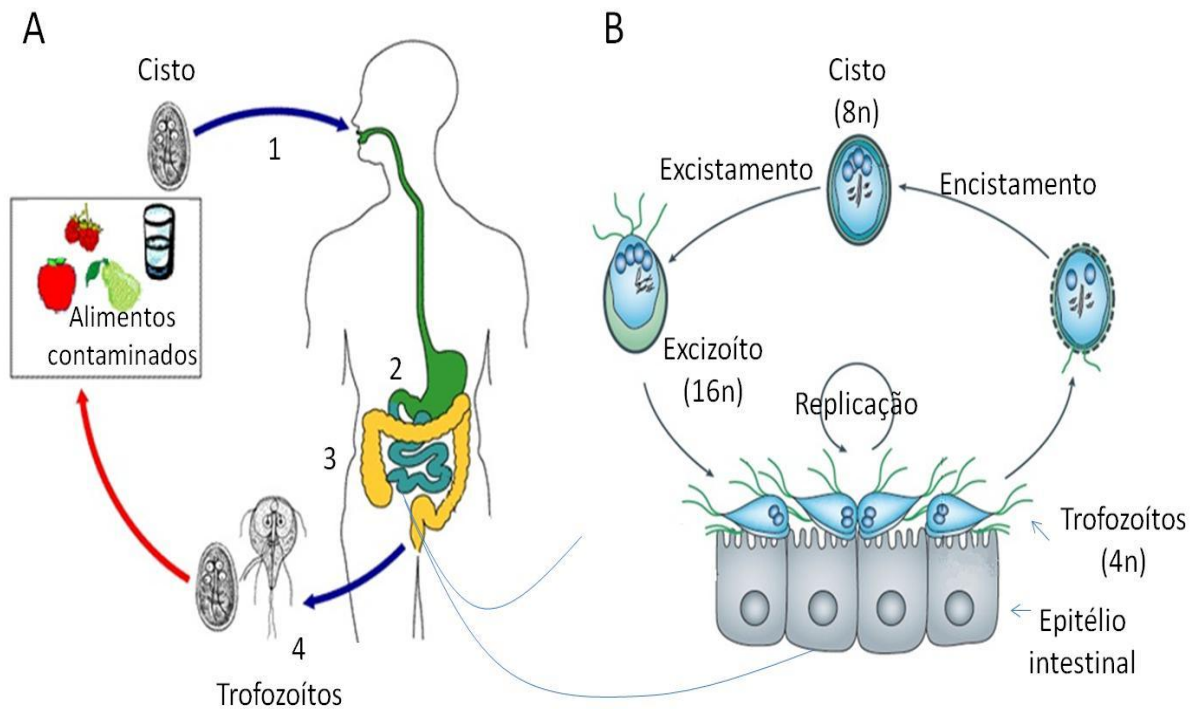


Figura 1.2. Ciclo biológico de *G. intestinalis* no homem. **A** | Alimentos contaminados com cistos podem ser ingeridos iniciando a infecção (1), durante a passagem pelo ambiente ácido do estômago ocorre o excistamento (2) e os trofozoítos colonizam o intestino delgado (3), posteriormente cistos são expulsos nas fezes e podem contaminar alimentos recomeçando o ciclo infeccioso (4); **B** | A exposição do cisto ao ácido gástrico provoca o excistamento. Os cistos diferenciam-se então numa forma de vida curta, o excizoíto. No interior do intestino delgado, os trofozoítos aderem às células intestinais e replicam-se. (A, adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Giardiasis.htm>; B, adaptado de Anarklev J, 2010).

1.5. Epidemiologia e transmissão da giardíase.

Giardia intestinalis é o parasita mais comum que coloniza o intestino delgado de vertebrados. Têm sido estimadas 280 milhões de infecções humanas sintomáticas por ano (21) e em 2004 foi incluída como parte da Iniciativa de Doenças Negligenciadas da OMS (22). A doença é de distribuição mundial, mas é especialmente prevalente em crianças nos países em desenvolvimento (17). Estudos recentes têm relacionado esta doença ao desenvolvimento de alterações gastrointestinais em seres humanos como síndrome do cólon irritável (23) e também com o déficit de crescimento em crianças (24). De acordo com a OMS (1996) cerca de 200 milhões de pessoas apresentaram sintomas de giardíase com mais de 500.000 novos casos descritos cada ano (25).

Sendo a giardíase uma zoonose, diferentes animais podem contribuir para a propagação dos cistos através da eliminação nas fezes (1). A infecção através do consumo de água contaminada com as formas infecciosas do parasita tem sido relatada como a via mais comum de disseminação do parasita. Surto da doença em países desenvolvidos têm sido atribuídos ao tratamento inadequado da água para consumo (4). A transmissão direta de pessoa-a-pessoa pode ocorrer através das mãos contaminadas, principalmente em locais de aglomeração humana, como orfanatos, asilos, creches e outros (26). A doença pode também ser considerada de transmissão sexual, uma vez que as superfícies corporais contaminadas estejam envolvidas no ato sexual (27).

Em 2005 Ekdahl *et al.* descreveram a epidemiologia da giardíase na Suécia e apresentaram estimativas do risco relativo de giardíase em pessoas provenientes de diferentes regiões do mundo, incluindo turistas, imigrantes e crianças adotadas (Figura 1.3) (28).

Estudos realizados em comunidades rurais da Guatemala indicaram a infecção de crianças com *G. intestinalis* nos três primeiros anos de vida (29). No Peru estudos de soroprevalência demonstraram que 40% das crianças apresentaram evidências de uma infecção passada ou presente na idade de 6 meses de vida (30).

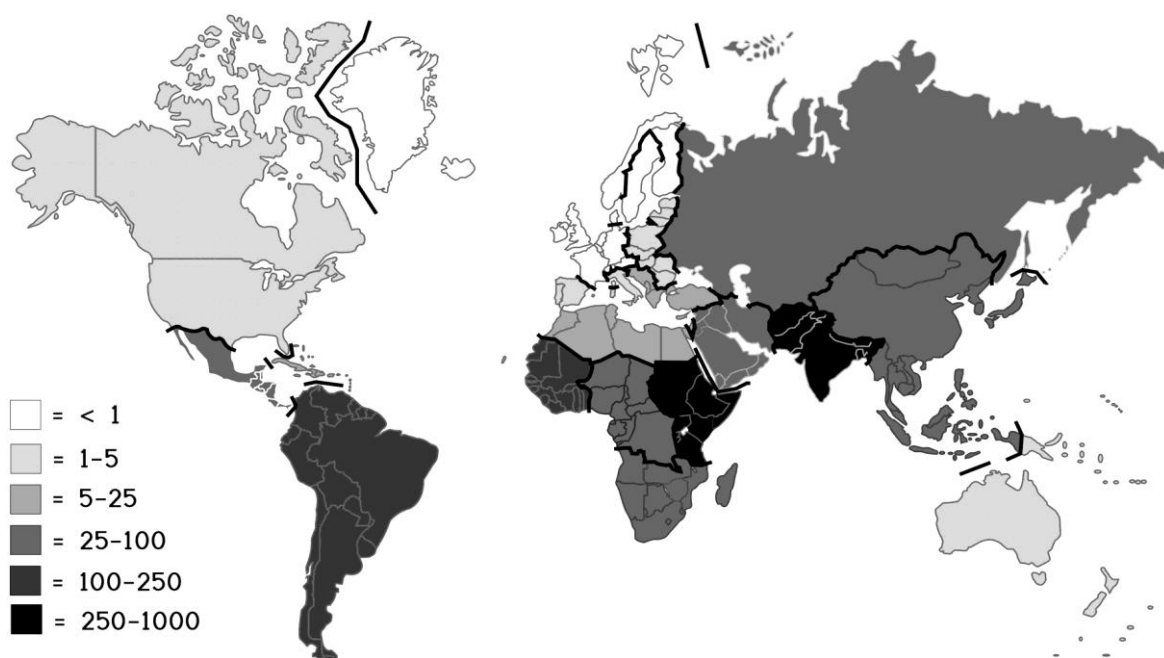


Figura 1.3. Estimativa de risco de infecção por *G. intestinalis* em viajantes retornando à Suécia. Mapa mostrando o risco de infecção por *G. intestinalis* por cada 100.000 viajantes retornando à Suécia de diferentes regiões do mundo (Ekdahl, K. 2005).

No Brasil, a prevalência de giardíase tem sido descrita como variável conforme a localidade e estudos coproparasitológicos demonstraram altos índices de infecção em regiões com infraestrutura urbana deficiente (31). A faixa etária mais atingida é a de crianças em idade escolar, constituindo-se, nessa população, um sério problema de saúde pública. Volotão e colaboradores (2007) reportaram uma prevalência de giardíase de 27,7% em crianças do Rio de Janeiro (32). Outras regiões do Brasil reportaram também a incidência desta doença em crianças. A prevalência foi de 51,8% em Aguari, Minas Gerais (33), enquanto que Lima e colaboradores (2013) reportaram uma positividade de 96,6% em crianças moradoras num assentamento de São Paulo, mesmo após o tratamento com 64,3% de positividade (34). Estudos realizados em outros estados do país indicaram prevalências semelhantes (35–38).

1.6. Diagnóstico.

O exame microscópico de fezes para identificar cistos e trofozoítos geralmente é o primeiro teste de diagnóstico realizado em pacientes com suspeita de giardíase. Os cistos são encontrados nas fezes da maioria dos pacientes positivos, enquanto que os trofozoítos são encontrados menos frequentemente e correlacionam-se com a infecção sintomática (39). Na coloração das amostras para observação microscópica pode ser usado iodeto de Lugol ou hematoxilina férrica (40)

Como a liberação de cistos de *G. intestinalis* pode ocorrer em intervalos irregulares, o exame das fezes pode fornecer resultados falso-negativos (26). A coleta de amostras em dias separados é recomendada e pode aumentar a eficiência do exame (41).

Outros métodos para a detecção de cistos intactos envolvem o uso de anticorpos, como a técnica de fluorescência direta, na qual os anticorpos estão acoplados a fluoróforos e os cistos são observados por microscopia. Testes imunoenzimáticos que detectam antígenos solúveis nas fezes também podem ser realizados (42) como o *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA). O ELISA tem sido utilizado tanto em amostras de fezes como em amostras de água. No entanto, ele parece não oferecer uma detecção superior aos métodos microscópicos e o custo é razoavelmente maior (40). A grande limitação dos testes imunológicos para a detecção do parasita *G. intestinalis* é baseado no fato de que estes não possuem sensibilidade suficiente em baixos níveis de infecção, requerem tempo e experiência técnica (42).

O uso de técnicas de PCR em tempo real para a identificação de *G. intestinalis* em fezes tem sido descrito como tão específico e sensível como a detecção de antígenos por ELISA e mais sensível do que a microscopia (43)

1.7. Fisiopatologia da giardíase.

As manifestações clínicas da infecção por *G. intestinalis* são extremamente variáveis entre os indivíduos afetados e podem abarcar desde infecções agudas até crônicas. No entanto, na maioria das pessoas infectadas é assintomática e a infecção frequentemente é resolvida de forma espontânea. Quando presentes, os sinais clínicos de infecção podem incluir náuseas, perda de peso, dor abdominal e diarreia. Estes sintomas aparecem 6-15 dias após a infecção, e

o impacto clínico é mais forte em crianças e em indivíduos desnutridos ou imunodeficientes (2).

O estudo histológico da mucosa duodenal e jejunal geralmente mostra nenhuma anormalidade em pessoas assintomáticas. No entanto, em indivíduos sintomáticos, as alterações podem incluir atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas, danos às células epiteliais, e extensa infiltração da lâmina própria por células plasmáticas, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares (26)

Interessantemente, a infecção em humanos por *G. intestinalis* caracteriza-se pela baixa inflamação da mucosa intestinal, sendo possível que o parasita regule negativamente a resposta inflamatória de maneira ativa através de produtos ainda desconhecidos (2,44).

Os trofozoítos causam a doença sem penetrar o epitélio, nem invadir os tecidos circundantes, nem entrar na corrente sanguínea e não secretam toxina conhecida (1,21,45).

A razão para estas diferentes manifestações clínicas não é totalmente clara, mas estas podem sofrer influências de diferentes fatores do hospedeiro, bem como a patogenicidade dos diferentes isolados de *G. intestinalis* ou fatores de virulência do parasita (17).

Poucos fatores de virulência foram identificados em *Giardia* spp. (Tabela 1.1) e alguns mecanismos foram propostos como importantes para a indução dos sintomas durante a evolução da doença (Tabela 1.2).

Tabela 1.1. Mecanismos fisiopatológicos propostos para a giardíase (2)

Mecanismos	Referências
Apoptose dos enterócitos	(45–47)
Perda da função de barreira epitelial	(45,48,49)
Hipersecreção de Cl ⁻	(48)
Absorção comprometida de glicose, água e Na ⁺	(45,48)
Encurtamento difuso das microvilosidades	(45,50)
Inibição de tripsina e de outras enzimas presentes nas microvilosidades	(51)
Interferência no metabolismo de sais biliares	(51)

Como descrito anteriormente, os sinais clínicos mais importantes da giardíase são diarreia e má absorção. No entanto, a patofisiologia associada com esses sintomas ainda não está completamente entendida. As primeiras ideias sobre patogênese sugeriram que os trofozoítos poderiam agir como uma barreira mecânica para a absorção ou competir por nutrientes do hospedeiro (26). No entanto Roxström (2006) discute que isto seria improvável, porque o tamanho do parasita (12x5 µm), a dose infecciosa (dez a 100 cistos) e o tempo de geração (~6-12 h in vitro) sugerem que a área de colonização após seis a dez dias seria extremamente pequena quando comparada com a superfície intestinal (44).

O crescimento bacteriano excessivo no intestino é comum em pacientes com giardíase e tem sido proposto como uma possível causa da diarreia. No entanto, este crescimento excessivo quando presente é variável e não está associado com a giardíase sintomática. Além disso, apenas o tratamento com antibióticos não resulta na melhoria dos sintomas (17), o que sugere que a diarreia da giardíase não está relacionada à proliferação bacteriana.

Tabela 1.2. Principais fatores de virulência de *Giardia* spp. (2)

Função	Fator de virulência	Referências
Adesão.	O disco adesivo e lectinas ventrais de superfície permitem a adesão e colonização do endotélio intestinal.	(19,52)
Evasão dos fatores naturais do lúmen intestinal.	A mobilidade flagelar permite a re-localização para novas células intestinais durante a colonização.	(1,53)
Alteração das defesas inatas do hospedeiro.	A liberação de arginina desiminase e outros produtos de <i>Giardia</i> spp. podem regular negativamente a produção de óxido nítrico produzido no epitélio.	(44,54,55)
Modificações anti-inflamatórias.	Produtos desconhecidos dos trofozoítos com funções anti-inflamatórias.	(44,45)

A fisiopatologia da giardíase ainda não está completamente entendida, por esta razão a identificação de outros possíveis fatores atualmente não descritos será de fundamental importância na compreensão dos mecanismos envolvidos na doença. A participação de microvesículas liberadas pelo parasita durante a infecção e posterior estabelecimento no hospedeiro poderia ser um mecanismo potencial, ainda inexplorado, envolvido na doença.

1.8. Vesículas extracelulares (VE).

A comunicação intercelular é uma característica essencial nos organismos, este processo pode ser mediado por contato direto célula-célula ou pela transferência de moléculas secretadas. Estruturas celulares, tais como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (Figura 1.4), podem ser liberadas pela maioria das células, e estudos recentes indicam que estas estruturas podem ter um papel crucial em processos fisiológicos e fisiopatológicos.

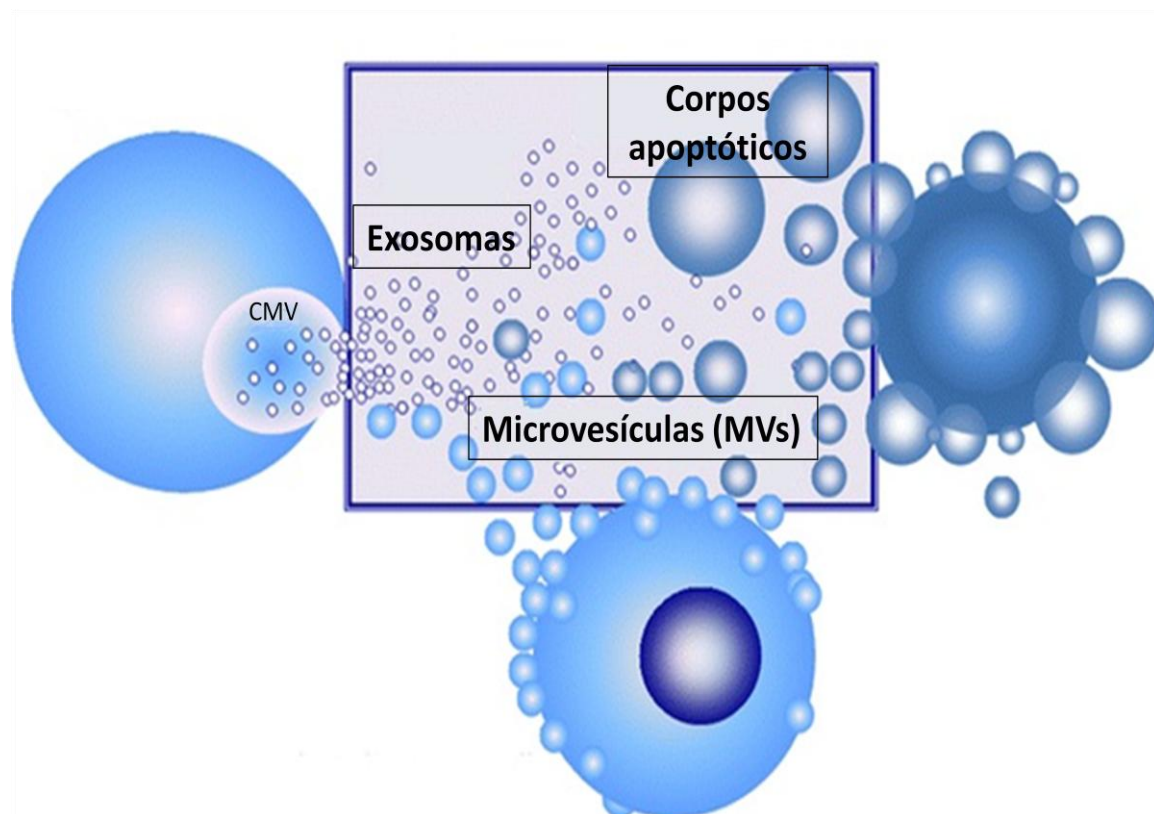


Figura 1.4. Representação esquemática de vesículas extracelulares. Principais populações incluem exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. CMV: corpos multivesiculares. (Modificado de György, B., 2011)

Os distintos tipos de vesículas de membrana (Figura 1.5) que podem ser liberadas pelas células incluem as microvesículas derivadas da membrana plasmática (MVs) e caracterizadas por apresentarem um diâmetro maior de 100 nm, os exossomos de tamanho menor (40-100 nm) originados de membranas de endossomos e os corpos apoptóticos (maiores que 1 μ m) caracterizados por conter material do núcleo celular (56).

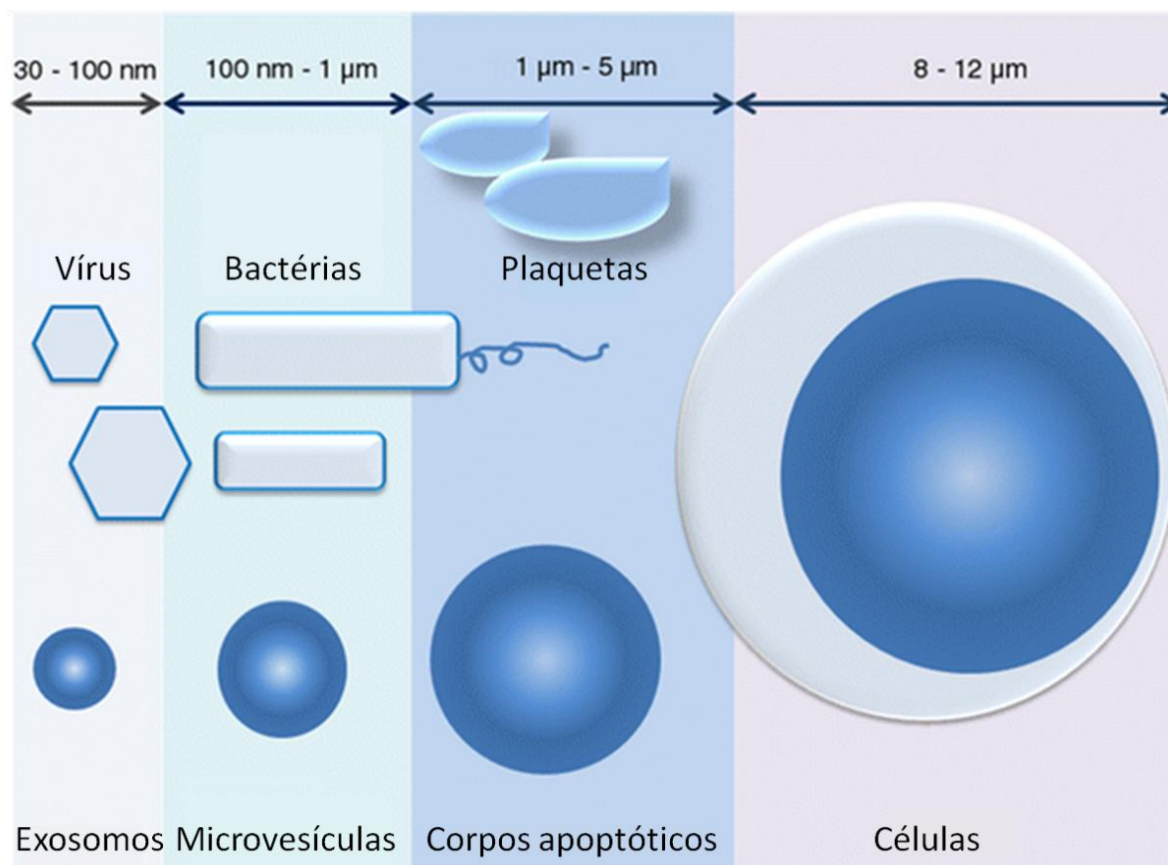


Figura 1.5. Faixas de tamanho dos principais tipos de vesículas de membrana. Escala de tamanho indicada na região superior da figura em nanômetros ou micrômetros. Vírus representados por formas hexagonais de tamanhos equivalentes a exosomos. Bactérias representadas por figuras retangulares de tamanho equivalente a microvesículas. Plaquetas representadas por formas ovais de tamanho equivalente a corpos apoptóticos. Célula representada por círculos sobrepostos como referencial aproximado de tamanho celular (Modificado de György, B., 2011).

Cada tipo de vesícula apresenta características diferentes (Tabela 1.3). Enquanto que a liberação de MVs e os corpos apoptóticos são um processo regulado a partir da membrana plasmática, os exosomos são liberados tanto constitutivamente como após indução por exocitose de corpos multivesiculares.

O conteúdo de exosomos e MVs inclui proteínas, mRNA e miRNA; no entanto, os corpos apoptóticos além de carregar estas moléculas contêm também DNA fragmentado. Este último tipo de vesícula extracelular é formada exclusivamente durante o estágio tardio da apoptose e não por células viáveis.

Tabela 1.3. Principais características das vesículas extracelulares (Modificada de Mathivanan *et al*, 2010)

	Exosomos	MVs	Corpos apoptóticos
Tamanho (diâmetro)	30-100 nm	100-1000 nm	1-5 μ m
Sítio de origem	Corpos multivesiculares	Membrana plasmática	-
Modo de liberação	Constitutiva e regulada	Regulada	Regulada
Mecanismo de geração	Exocitose de corpos multivesiculares	Brotamento na membrana plasmática	Brotamento na membrana plasmática
Composição	Proteínas, miRNA, mRNA	Proteínas, miRNA, mRNA	Proteínas, miRNA, mRNA, DNA.

Apesar de que as vesículas extracelulares de modo estrito incluam exosomos, microvesículas e corpos apoptóticos, no presente trabalho o termo fará referência unicamente aos dois primeiros tipos de vesículas.

1.10. Métodos de isolamento e caracterização das vesículas extracelulares.

De acordo com Théry e colaboradores (2006), um dos principais desafios no estudo das VEs é a melhora e padronização dos métodos de isolamento e análise destas estruturas. Atualmente, a maioria dos estudos publicados tem empregado técnicas de centrifugação diferencial seguidas de ultracentrifugação, tornando esta metodologia como a mais amplamente usada no processo de isolamento. As condições de centrifugação aplicadas vão de

18.000xg durante 30 min. até 100.000xg durante 1 h (56, 57). Uma vez isoladas, o PBS é a solução tampão mais comumente escolhida para ressuspender as VEs (59–64).

O uso de gradientes de sacarose durante a ultracentrifugação é também amplamente aceito para o isolamento baseado na densidade das VEs, no entanto a densidade das MVs não é conhecida (65).

A posterior caracterização das VEs isoladas requer técnicas de imagem, espectrometria de massas e ensaios bioquímicos, como *immunoblotting*.

A citometria de fluxo é uma técnica conveniente na quantificação de vesículas extracelulares, mas ela tem limitações graves na resolução de estruturas inferiores de 200 nm (66,67). Portanto, esta metodologia não é adequada para a análise de exossomos e MVs menores porque não são discriminados do ruído do instrumento. Apesar destas limitações, esta técnica é amplamente utilizada para a detecção de MVs (67).

As técnicas de microscopia eletrônica têm sido demonstradas serem úteis em estudos envolvendo VEs (64). O uso de metais pesados, tais como tetróxido de ósmio e acetato de uranila, permite o reconhecimento de vesículas rodeadas por membrana.

Mais recentemente, a análise por monitoramento de nanopartículas (Nanosight) permite a obtenção da concentração e distribuição de tamanho das populações de VEs através do estudo do movimento Browniano das vesículas em suspensão (68).

As técnicas convencionais de *Western blot* são também amplamente usadas no estudo da presença de proteínas presentes nas VEs, mas a técnica não é adequada para a determinação da quantidade de VEs presentes nas amostras (67).

1.11. Biogênese e liberação de vesículas extracelulares.

Os exossomos são gerados pela invaginação das membranas de endossomos formando vesículas intraluminais dentro de corpos multivesiculares (Figura 1.6). A liberação dos exossomos ocorre pela fusão da membrana de corpos multivesiculares com a membrana

plasmática com posterior exocitose das vesículas intraluminais que então são denominadas exossomos.

Diferentemente dos exossomos, as MVs não são geradas na via endocítica. O processo ocorre na membrana plasmática onde acontece o brotamento da vesícula, seguido de fissão da membrana, com a consequente liberação da estrutura no meio extracelular (Figura 1.6).

A maquinaria envolvida no processo de liberação de MVs ainda está numa fase precoce de compreensão (69). Estudos em células de mamíferos indicam que durante o processo de brotamento e liberação de MVs acontece um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático e a perda da assimetria de fosfolipídios da membrana plasmática.

Em condições de repouso, a monocamada externa apresenta enriquecimento em fosfatidilcolina e esfingomielina, enquanto que a monocamada interna contém fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Esta distribuição assimétrica entre as monocamadas da membrana plasmática é o resultado do ativo processo de transportadores de fosfolipídios. No entanto, após o aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático ocorre a ativação de enzimas como a escramblase – enzima envolvida no transporte de fosfolipídios a favor do gradiente de concentração destas moléculas – e a inativação de translocases com atividade de *flippase* que em condições de repouso mantêm os fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina na monocamada interna. Como consequência, a distribuição assimétrica dos fosfolipídios nas monocamadas internas e externas da membrana plasmática é rapidamente alterada. O aumento de Ca^{2+} no citoplasma também ativa enzimas como a calpaína e a gelsolina, estas enzimas desorganizam o citoesqueleto pela clivagem dos filamentos de actina. Como resultado a liberação de MVs ocorre através do brotamento da vesícula a partir da membrana plasmática com a exposição de PS e PE na superfície exterior das MVs (56)

A taxa de liberação de MVs aumenta drasticamente após estimulação. O íon Ca^{2+} tem sido reportado como um forte indutor neste processo (70). No entanto, segundo Cocucci e colaboradores (2009), independentemente do tipo de estímulo aplicado às células, a geração de MVs ocorre a partir de um pequeno intervalo de tempo, e não de forma concomitante ao estímulo. Este tempo de liberação pode ser estimado entre umas poucas dezenas de segundos até 1-2 minutos.

Estudos envolvendo inibidores de síntese de colesterol têm mostrado também a participação crucial dos microdomínios de membrana ricos em colesterol (*lipid rafts*) na formação de microvesículas (71,72). No entanto, estes microdomínios encontram-se também envolvidos na biogênese de exossomos (73).

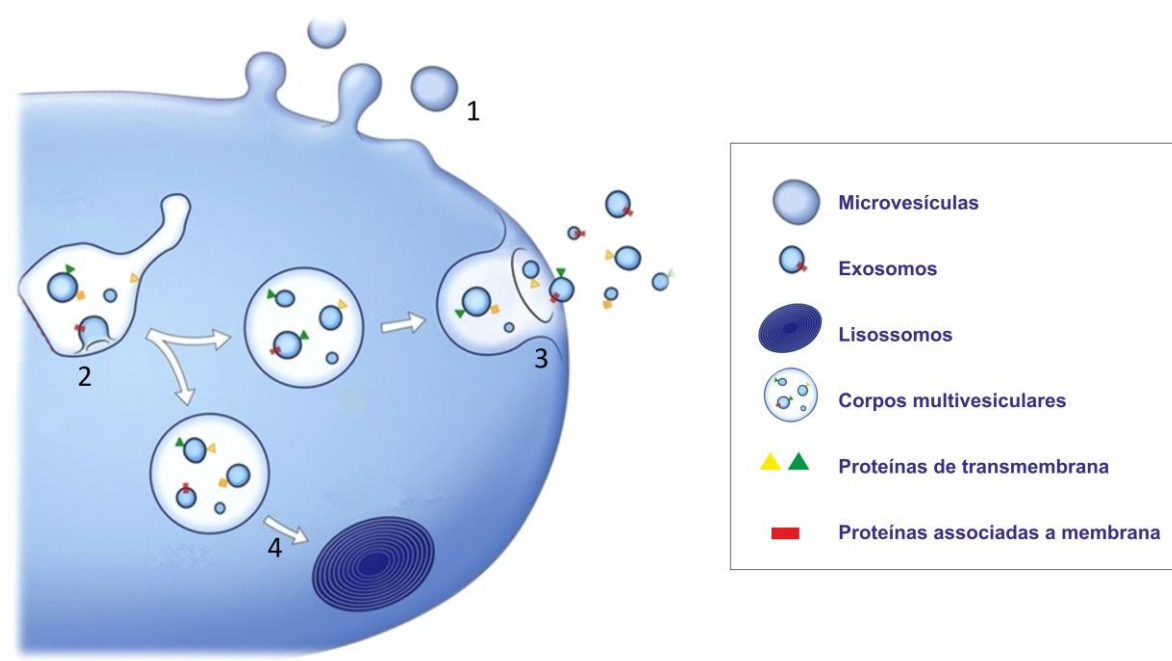


Figura 1.6. Liberação de microvesículas e exossomos. As MVs originam-se diretamente por brotamento da membrana plasmática (1). Os exossomos, por sua vez, são formados no interior de corpos multivesiculares (MVBs) por invaginação das membranas de endossomos precoces (2). Posteriormente, os exossomos são liberados pela fusão de MVBs com a membrana plasmática (3). No entanto, MVBs podem sofrer fusão com lisossomos (4). Símbolos representativos apresentados na figura estão indicados no quadro à direita (Modificado de Raposo, G. 2013)

1.12. Composição de vesículas extracelulares.

De acordo com o processo de biogênese, as VEs podem ser diferenciadas entre exossomos e MVs. Uma classificação baseada apenas de acordo com a composição apresenta problemas, principalmente em virtude da falta de propriedades físicas exclusivas ou de marcadores moleculares únicos de cada tipo de EV (74). Devido ao potencial papel das vesículas extracelulares em processos fisiológicos assim como patológicos, existe um grande interesse em conhecer a composição molecular destas estruturas de membrana.

As vesículas extracelulares são compostas de uma bicamada lipídica na qual são expostas proteínas e receptores. A presença de PS na superfície é uma das principais características descritas como marcador da presença de vesículas. Outra característica destas estruturas de membrana é o enriquecimento de proteínas associadas com *lipid rafts* (65). Os *lipid rafts* são microdomínios de membrana que contêm elevados níveis de colesterol e esfingolipídios. Os lipídios de membrana e proteínas são classificados no microdomínio, permitindo interações envolvidas em processos celulares como transdução de sinais, adesão, organização do citoesqueleto, entre outros (75).

No interior, são encontrados componentes do citosol como enzimas, fatores de transcrição e diferentes tipos de RNA derivados da célula parental (Figura 1.7). Não obstante, o material contido nas VEs não é um mero reflexo do conteúdo da célula de origem. Vários autores descreveram que durante o processo de biogênese das VEs ocorre não apenas o acúmulo de moléculas específicas, mas também a redução de outras, na membrana e no interior destas estruturas (61,76–78). Os mecanismos subjacentes neste processo de seleção de moléculas não são ainda compreendidos.

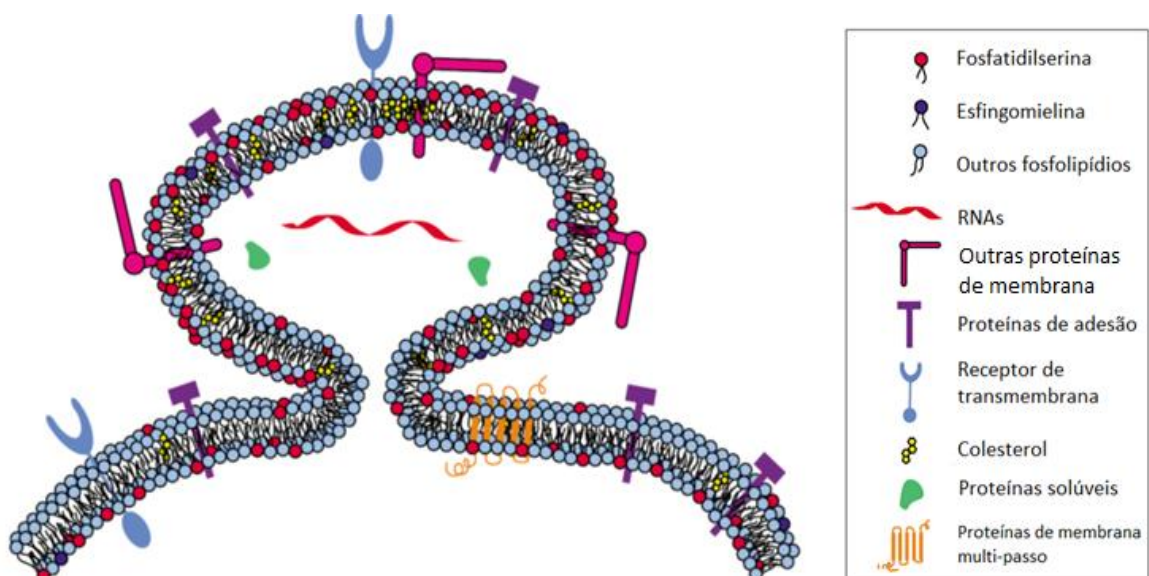


Figura 1.7. Esquema de composição de moléculas nas MVs. As MVs são compostas de uma bicamada de fosfolipídios e são geradas pelo brotamento exterior da membrana plasmática, tal como mostrado na figura. Nem todas as proteínas da membrana plasmática são incorporadas na MV em formação. Símbolos representativos das moléculas que compõem a estrutura da membrana celular e MV estão indicados no quadro à direita (Adaptado de Muralidharan-Chari, V. 2010).

As moléculas contidas nas VEs podem ser direcionadas para as células alvo após interação e terem efeitos nestas células como: progressão de tumores, imunomodulação, apresentação de antígenos entre outros (69,79–81).

1.13. Interação das vesículas extracelulares com a célula-alvo.

As funções das VEs em processos fisiológicos ou patológicos dependem da sua capacidade de interagir com as células-alvo. Têm sido descritos diferentes tipos de interação das VEs com a célula-alvo (56,82). Em alguns casos, esta interação é restringida à superfície celular e está mediada por ligação a receptores. As consequências deste tipo de interação poderiam estar limitadas a sinalizações através de receptores. Em outros, no entanto, a ligação a receptores é seguida por fusão da vesícula com a membrana plasmática da célula alvo; ou inclusive a captação endocítica da vesícula. Neste último caso, as VEs podem permanecer dentro de endossomos e serem direcionadas para um lisossomo; alternativamente, pode ocorrer a fusão da membrana da VE com a membrana do endossomo, com a consequente descarga do conteúdo para o citoplasma (transferência horizontal); ou as VEs podem ser devolvidas para o espaço extracelular após fusão da membrana do endossomo contendo VEs com a membrana plasmática (transcitose) (Figura 1.8).

Desta forma, a interação de VEs com células-alvo permite a transferência intercelular de componentes de membrana. Além de moléculas de superfície e proteínas citoplasmáticas, também mRNAs e miRNAs podem ser direcionados para as células-alvo. Esta transferência pode representar um mecanismo de intercâmbio genético intercelular, permitindo que diferentes tipos celulares influenciem no fenótipo de outras células.

Vários estudos indicariam que as VEs não interagem com qualquer célula após o contato ocorrer, mas sim apenas com as células que reconhecem especificamente. Por exemplo, as vesículas liberadas por plaquetas interagem com macrófagos e células do endotélio, mas não com neutrófilos. Esta especificidade pareceria estar determinada por moléculas de adesão presentes na superfície das VEs.

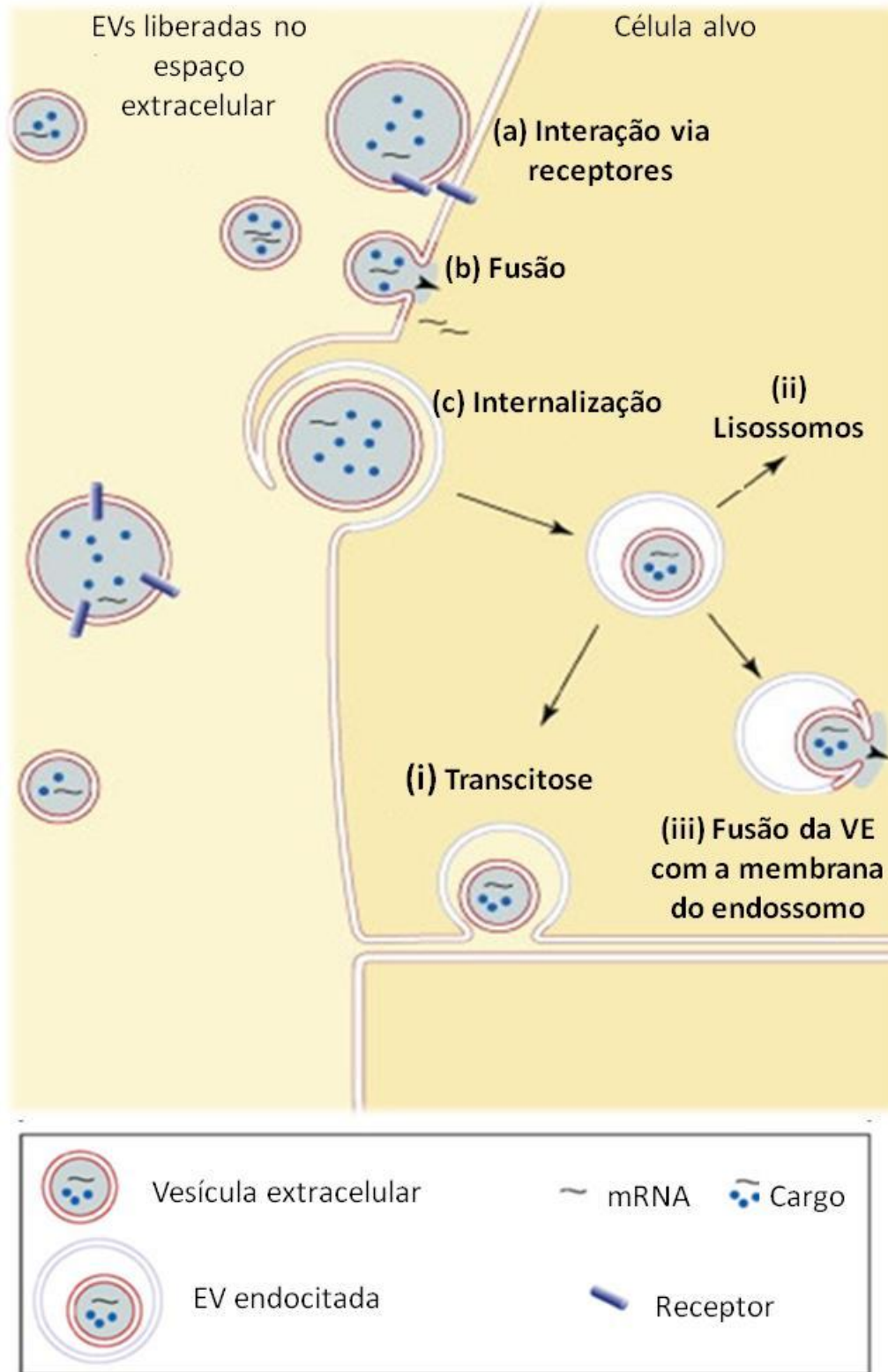


Figura 1.8. Interações de vesículas extracelulares com as células alvo. Símbolos representativos apresentados na figura estão indicados no quadro inferior. As setas indicam a direção de descarga do material carregado que ocorre após internalização da vesícula pela célula alvo (Modificado de Cocucci, E. 2009)

1.14. Papel das VEs em doenças infecciosas.

O reconhecimento inicial das VEs como estruturas envolvidas principalmente em oncogênese e na coagulação do sangue tem sido ampliado com estudos recentes que revelaram aspectos novos em outros processos fisiológicos, tais como a interação patógeno-hospedeiro.

A produção de VEs é considerada atualmente uma característica da vida celular e tem sido demonstrada em organismos tão distintos quanto Archaea e proteobactérias, plantas, fungos, protozoários e animais (83).

Mais recentemente tem sido descrito na literatura que patógenos podem liberar vesículas extracelulares. Já foi reportado que alguns patógenos, ou células infectadas por estes, liberam VEs incluindo vírus como Epstein Barr (84), HIV (85), hepatite C (86); bactérias como *Helicobacter pylori* (87), *Legionella pneumophila* (88), *Mycobacterium tuberculosis* (89); fungos como *Cryptococcus neoformans* (90), *Paracoccidioides* (91); helmintos como *Echinococcus multilocularis* (92), *Caenorhabditis elegans* (93), *Fasciola hepática* e *Echinostoma caproni* (94); e também protozoários (Tabela 1.4), por exemplo *T. vaginalis* e *T. cruzi* podem liberar VEs durante a interação com o hospedeiro e participar do processo de infecção (Figura 1.9)

Tabela 1.4. Doenças infecciosas nas quais as VEs liberadas por protozoários desempenham um papel no desenvolvimento da patogênese.

Agente etiológico	Doença	Função das VEs	Referências
<i>T. vaginalis</i>	Tricomoniase	Direcionamento de fatores de virulência e aumento da adesão de parasitas.	(61)
<i>T. cruzi</i>	Doença de Chagas	Direcionamento de fatores de virulência e aumento da invasão de formas infecciosas.	(95,96)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malária	Transferência de antígenos plaquetários para a superfície de hemácias	(97)

Continuação. Tabela 1.4. Doenças infecciosas nas quais as VEs liberadas por protozoários desempenham um papel no desenvolvimento da patogênese.

<i>Plasmodium yoelii</i>	Malária	VEs derivadas de reticulócitos infectados protegem camundongos de infecção letal.	(98)
<i>Plasmodium berghei</i>		Ativação de macrófagos	(99)
<i>Plasmodium vivax</i>		Elevados níveis de VEs foram relacionados com a duração dos sintomas	(100)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose	Estimulação de resposta pró-inflamatória	(101)
<i>Leishmania spp</i>	Leishmaniose	Direcionamento de fatores de virulência	(60)
<i>Trypanosoma brucei</i>	Doença do sono	Exportação de proteínas	(102)

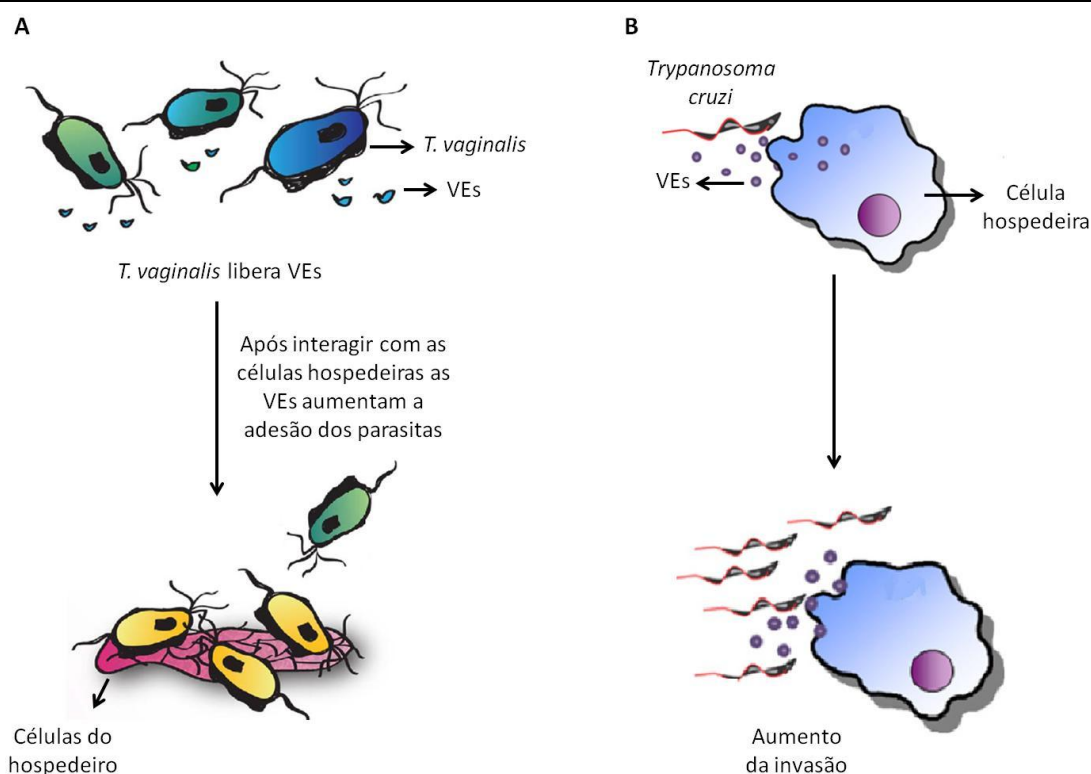


Figura 1.9. Exemplos do papel das vesículas extracelulares liberadas por parasitas na interação patógeno-hospedeiro. A | *T. vaginalis* libera VEs que fundem com as células do hospedeiro e aumentam a adesão dos parasitas nestas células (Adaptado de Twu, O.2013); B | VEs liberadas por trypomastigotas de *Trypanosoma cruzi* servem como fatores de virulência, são internalizadas pelas células hospedeiras e aumentam a invasão do parasita (Adaptado de Torrecilhas, A. 2012)

Os parasitas têm desenvolvido distintas estratégias de transmissão que lhes permitem sobreviver e se reproduzir no hospedeiro. As VEs apresentam-se como um mecanismo potencial de participação na infecção e evasão da resposta imune. A investigação sobre os mecanismos da fisiopatologia da giardíase relacionada com a possível participação de MVs do parasita pode ajudar a identificar alvos terapêuticos no combate da doença. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os mecanismos de produção de MVs por trofozoítos de *G. intestinalis* e o papel destas estruturas na interação com as células hospedeiras. Os dados são os primeiros em indicar um papel das MVs na progressão da infecção.

II. OBJETIVOS

○ Geral

Caracterizar os mecanismos de microvesiculação de trofozoítos de *G. intestinalis* e determinar o papel das microvesículas na interação com células hospedeiras.

○ Objetivos específicos

- Caracterizar as MVs de trofozoítos de *G. intestinalis* e o processo de liberação em diferentes condições.
- Avaliar a participação de microdomínios de membrana (*lipid rafts*) no processo de formação de MVs por trofozoítos de *G. intestinalis*.
- Avaliar a presença de RNA nas MVs isoladas de *G. intestinalis*.
- Caracterizar de forma qualitativa o conteúdo proteico das MVs liberadas por trofozoítos durante o processo de encistamento.
- Caracterizar a participação das MVs de trofozoítos de *G. intestinalis* em ensaios de interação com células Caco-2.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Culturas celulares*

Foram utilizados trofozoítos de *G. intestinalis* (cepa WB) cultivados axenicamente em meio TYI-S-33 modificado (7,12 mM K₂HPO₄, 4,41 mM KH₂PO₄, 17,11mM NaCl, 3% extrato de levedura, 0,05% bile bovina, 55,55 mM Glicose, 16,5 mM L-Cisteína, 1,14 mM Ácido ascórbico, pH 7) (103) contendo 10% de soro bovino adulto (Cultilab), em tubos de vidro inclinados e a 37 °C ajustado a pH 7 (salvo quando indicado o contrário) e enriquecido com 10% de soro bovino adulto (Cultilab). Os parasitas foram subcultivados (1x10⁵/mL) a cada 3 dias para manter a linhagem.

Para os experimentos foram utilizados trofozoítos na fase logarítmica de crescimento. Estes foram coletados incubando o tubo de crescimento em gelo durante 15 minutos com posterior centrifugação a 600xg, durante 5 min. O pellet resultante foi lavado com meio TYI-S-33 sem soro e ressuspensão no meio e na concentração desejados.

Células do epitélio intestinal humano Caco-2 (originalmente obtida de um adenocarcinoma de cólon humano) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) inativado (30 min. a 56°C), 2mM de L-Glutamina, acrescido de 100g/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas através de passagens semanais utilizando solução de tripsina 0,02% (Sigma-Aldrich) contendo 3 mM de EDTA durante 10 min. Os experimentos e a manutenção das células foram realizados em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂.

3.2. *Encistamento in vitro.*

A indução de cistos foi realizada de acordo com Kane e colaboradores, 1991 (104). Foram cultivados trofozoítos de *G. intestinalis* (cepa WB) até atingir confluência. Logo após, foi removido o meio TYI-S-33 junto com os parasitos não aderidos. Posteriormente, foi adicionado meio de encistamento: TYI-S-33 com 10mg/mL de bile bovina ajustado a pH 7,8.

O meio foi previamente filtrado com membrana de 0,1 μ m (Millipore) para evitar contaminação com vesículas do soro. As culturas foram mantidas em meio de encistamento durante 24 horas a 37°C.

3.3. Obtenção e quantificação de microvesículas

Os parasitas foram lavados duas vezes com meio TYI-S33 sem soro a 4°C. Posteriormente 1x10⁶ trofozoítos foram incubados em tubos eppendorfs contendo 1 mL de com meio TYI-S33 sem soro (pH 7) acrescido de 1mM/mL de CaCl₂ (Sigma-Aldrich). A incubação procedeu durante 1 hora a 37 °C. As MVs foram separadas dos trofozoítos mediante centrifugação diferencial: após centrifugação a 600xg durante 5 min., o sobrenadante foi novamente centrifugado a 4000xg durante 30 min. (este procedimento duas vezes). O pellet contendo debris celulares foi descartado e o sobrenadante contendo as MVs foi ultracentrifugado a 100.000xg durante 90 min. em temperatura de 4°C (ultracentrífuga Beckman Coulter, Inc.). Após o descarte do sobrenadante as MVs foram ressuspensas em PBS previamente filtrado com membrana de 0,22 μ m (Millipore) e guardadas a 4°C. As MVs foram quantificadas por citometria de fluxo (BD FACScalibur) em gráficos de tamanho e granulosidade (FSC x SSC) de escala logarítmica, e discriminadas dos debris celulares utilizando um *gate* desenhado a partir de 10¹ eventos (tanto em FSC quanto SSC). O volume do material analisado foi medido antes e depois da leitura no citômetro e o número de MVs final foi determinado dividindo-se o número de eventos obtidos na citometria pelo volume de material analisado, ou seja, MVs/ μ L. As análises foram realizadas no software Summit (versão 4.3). A quantificação foi realizada também por dosagem de proteína utilizando kit de BCA (Pierce Thermo Scientific) a partir de uma curva padrão de Albumina.

3.4. Marcação de MVs com Anexina-V-FITC.

MVs isoladas de trofozoítos de *G. intestinalis* foram incubadas com Anexina V-FITC (2,5 µg/mL; BD Biosciences) em tampão HEPES (10mM HEPES, 10 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) durante 20 min. a temperatura ambiente. Logo após, as MVs marcadas foram analisadas em histograma de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo.

3.5. Depleção de colesterol

Com o objetivo de analisar o papel dos *lipid rafts* na adesão e liberação de MVs de *G. intestinalis*, trofozoítos foram pré-tratados com 2.5, 5, 10 mM de metil-β-ciclodextrina (MβCD; Sigma) durante 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS, 1x10⁶ parasitas foram cultivados em meio TYI-S33 sem soro na presença de CaCl₂, para a produção de MVs. Em outro ensaio, parasitas (1x10⁶) tratados com MβCD foram incubados durante 2 h com células Caco-2 e a adesão às células hospedeiras foi quantificada em câmara de Neubauer, como mais amplamente descrito na secção 3.10.

3.6. Extração de RNA das MVs.

O RNA total foi obtido a partir de MVs isoladas, ou de formas trofozoitais íntegros, seguindo o protocolo do Trizol (Invitrogen). Inicialmente, adicionou-se 1 mL do reagente Trizol nas amostras. A lise dos parasitas ou das MVs foi feita através da homogeneização suave da solução. Após 5 min. de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e a homogeneização foi realizada através da inversão dos tubos contendo as amostras. Após 3 min. de incubação foi realizada uma centrifugação a 12.000 xg/15 min. a 4 °C e, em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com a adição de 7,5 µg de glicogênio em 0,5 mL de isopropanol a -20 °C durante 16 horas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 12.000xg/10 min. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 7.500xg/5 min. a 4 °C, os sobrenadantes foram descartados e o pellet

foi submetido ao contato com o ar para que evaporasse o etanol restante. A solubilização do RNA foi realizada em água livre de RNases 55 °C durante 10 min. Os RNAs isolados foram armazenados sob refrigeração a -80 °C até o momento de uso.

As amostras de RNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE, a 100 V por aproximadamente 30 min. Posteriormente, os geis foram corados com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, visualizados por transiluminação com luz UV e as imagens foram capturadas pelo sistema de documentação de gel.

3.7. Análise proteômica das MVs de G. intestinalis

As MVs liberadas por trofozoítos e por trofozoítos induzidos ao processo de encistamento foram isoladas como anteriormente descrito e secas através de centrifugação à vácuo. Posteriormente, foram enviadas para a Seção de Proteômica da Universidade de Valencia (Espanha) onde foram processadas e sequenciadas.

Os pellets insolúveis de cada amostra foram fervidos por 5 min. a 95 ° C com 100 uL de tampão de Laemmli 1x. 25 µL de cada solução de proteínas foi aplicada em gel de SDS/PAGE 1D de 12,5% de acrilamida. Após a corrida, cada amostra foi excisada e processada. Foi realizada a digestão com tripsina (2,5 ng / mL; Promega) como descrito por Shevchenko e colaboradores (105).

O material digerido foi desidratado numa centrífuga à vácuo e ressuspenso em 50 uL de acetronitrila (ACN) 2%, ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Logo após, 1 uL de cada amostra foi colocada em coluna *NanoLC Column* (3µ C18-CL, 100umx15cm ; Nikkyo) e dessalinizada com 0,1% de TFA em 2µl/min. durante 10 min. Os peptídeos foram aplicados na coluna analítica *LC Column* (3 µ C18-CL, 75umx12cm, Nikkyo) equilibrada com 5% de ACN a 0,1% de ácido fórmico (AF). A eluição dos peptídeos foi realizada num gradiente linear de 5 a 35% ACN, 0.1% num fluxo de 300nl/min. Peptídeos foram analisados em espectrômetro de massa *nanoESI qQTOF* (5600 TripleTOF, ABSCIEX).

O tripleTOF foi operado no modo de aquisição dependente de informações, em que um de 0,25 s TOF MS digitalizar a partir de 350-1250 m / z, foi realizada, seguida por 0,05 s-scans íon produto de 100 - 1500 m / z sobre os 50 mais intensos 2-5 íons carregados.

Os dados obtidos no sequenciamento MS/MS (combinado a partir de três 3 corridas de uma amostra) foram confrontados com a base de dados NCBI nr EST utilizando o programa MASCOT v2.3.02.

As buscas foram feitas com especificidade tríplica, permitindo uma perda de clivagem máxima e uma tolerância na medição de massa de 50 ppm em modo de MS e 0,6 Da para íons MS/MS. Carbamidometilação de cisteína foi usado como uma modificação fixa, e como modificações variáveis foram consideradas a oxidação de metionina e desamidação de asparagina e glutamina.

As proteínas apresentando um *score* maior do que a homologia ou que o limiar significativo foram identificadas com confiança $\geq 95\%$.

3.8. Ensaios de interação MVs-células hospedeiras.

A marcação das MVs foi realizada com kit PKH26-red (marcador fluorescente lipofílico, Sigma-Aldrich) (76). MVs previamente isoladas conforme descrito anteriormente foram ressuspensas em tampão *Diluent C* junto com o marcador (4 μ M). A reação de marcação foi interrompida após 5 min. pela adição de 1% de BSA durante 1 min. antes da ultracentrifugação a 100.000 g durante 70 min. para logo após as MVs serem ressuspensas em PBS.

As MVs marcadas foram incubadas com células Caco-2 durante 30 min. Logo após, o sobrenadante foi retirado com duas lavagens, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%. Em outro ensaio, células Caco-2 foram pré-tratadas com citocalasina D (0,5 μ M), um inibidor da fagocitose, durante 30 min. e posteriormente incubadas com MVs. O tempo de interação, as lavagens e fixação foram realizados como descrito anteriormente. Posteriormente, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência (Carl Zeiss) com o uso do programa Zen 2011 Blue edition.

3.9. Avaliação da proliferação celular.

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). O método se baseia na redução de sais de tetrazolium (MTS) em formazano (composto colorado). A produção de formazano é proporcional ao número de células viáveis em cultura. Neste ensaio células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços numa densidade de 5×10^3 células/poço e incubadas na presença de MVs de trofozoítos de *G. intestinalis* durante 24 h. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante 3 h com 317 µg MTS/ml. Logo após, a absorvância do MTS reduzido a formazan foi detectada a 490 nm. Baseado nos dados de absorvância foi calculada a porcentagem de proliferação (prol%) celular com a seguinte fórmula:

$$\text{prol}(\%) = \frac{\text{média da absorvância da amostra} \times 100}{\text{média da absorvância do controle}}$$
 Os resultados são apresentados como porcentagens relativas aos controles.

3.10. Ensaios de adesão.

Os ensaios de adesão foram realizados de acordo com Sousa *et al.*, 2001(106). Culturas confluentes de células Caco-2 foram lavadas em meio RPMI 1640 sem soro e tratadas com tripsina durante 10 minutos a 37°C. As células soltas foram transferidas imediatamente para tubos plásticos estéreis de 15 mL contendo meio RPMI com 10% de soro fetal bovino e centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Em seguida, as células foram inoculadas em placas de cultura de tecidos de 6 poços.

Os tubos de vidro contendo os parasitas em cultura foram incubados em gelo durante 15 minutos e centrifugados a 600xg durante 5min. Os parasitos foram lavados com RPMI 1640 sem soro e uma alíquota foi contada em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para se obter a concentração desejada de trofozoítos por mililitro.

Uma vez em confluência, as células Caco-2 inoculadas nas placas foram lavadas suavemente com meio RPMI sem soro, aquecido previamente a 37°C.

Imediatamente uma suspensão com 3×10^6 trofozoítos foi adicionada aos poços contendo as células Caco-2, num volume final correspondente a 3 mL por poço. A placa foi incubada durante 1 ou 3 h a 37°C. Após este intervalo, os parasitas não aderidos foram retirados lavando suavemente as placas de cultura três vezes com PBS a 37°C. Seguidamente, recuperaram-se os trofozoítos aderidos por incubação a 4°C durante 30 min. Parasitas aderidos e não aderidos foram quantificados em câmara de Neubauer. Os resultados são apresentados como o número de vezes de aumento da adesão em relação aos grupos controles.

3.11. Análise estatística.

Os resultados são expressos como a média e desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.04. O test de *t-student* foi usado nos ensaios pareados. A análise por ANOVA foi aplicada nos ensaios de proliferação celular. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

IV. RESULTADOS

4.1. As MVs de trofozoítos de G. intestinalis apresentam PS na superfície e são liberadas de modo dependente de cálcio.

A liberação de vesículas parasitárias no espaço extracelular tem sido descrita por vários grupos nos últimos 20 anos. No entanto, o mecanismo pelo qual os parasitas produzem essas estruturas de membrana continua em grande parte não entendido (95)

Na literatura foram descritos vários marcadores presentes nas MVs (65), entre eles PS é considerado um marcador típico apresentado na superfície destas estruturas (56). Para avaliar se os trofozoítos de *G. intestinalis* liberam MVs, os parasitas foram incubados em meio TYI-S-33 modificado sem soro durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, o meio de cultura foi centrifugado diferencialmente com posterior ultracentrifugação, de acordo com Cestari *et al* (2012). Logo após, o pellet foi resuspenso em tampão de marcação com Anexina V-FITC, que na presença de Ca^{2+} se liga a PS.

A análise da marcação foi determinada por citometria de fluxo a partir de um *gate* no gráfico de tamanho e granulosidade (FSC x SSC). A marcação por Anexina foi determinada nos eventos do *gate*, em um histograma de fluorescência (Figuras 4.1 A e B, respectivamente). Os resultados indicaram que 70% dos eventos registrados foram positivos para Anexina-V sugerindo a presença de MVs com exposição de PS na superfície da membrana. Foi também observada a heterogeneidade das MVs, refletidas por uma dispersão simultânea em direção a valores mais elevados do FSC e SSC (Figura 4.1.A).

Os ensaios posteriores avaliados por citometria de fluxo foram analisados usando os parâmetros estabelecidos neste experimento.

Na literatura tem sido reportado que a liberação de MVs depende da concentração de cálcio intracelular e estímulos químicos como ionóforos. Para testar se os trofozoítos de *G. intestinalis* liberam MVs de forma dependente de cálcio, 1×10^6 /mL parasitas foram incubados na presença de 1 mM de $CaCl_2$. Como controle positivo os parasitas foram incubados na presença de ionóforo de cálcio e como controle negativo, foi determinado o comportamento da amostra na ausência de cálcio, incubando os parasitas com EGTA.

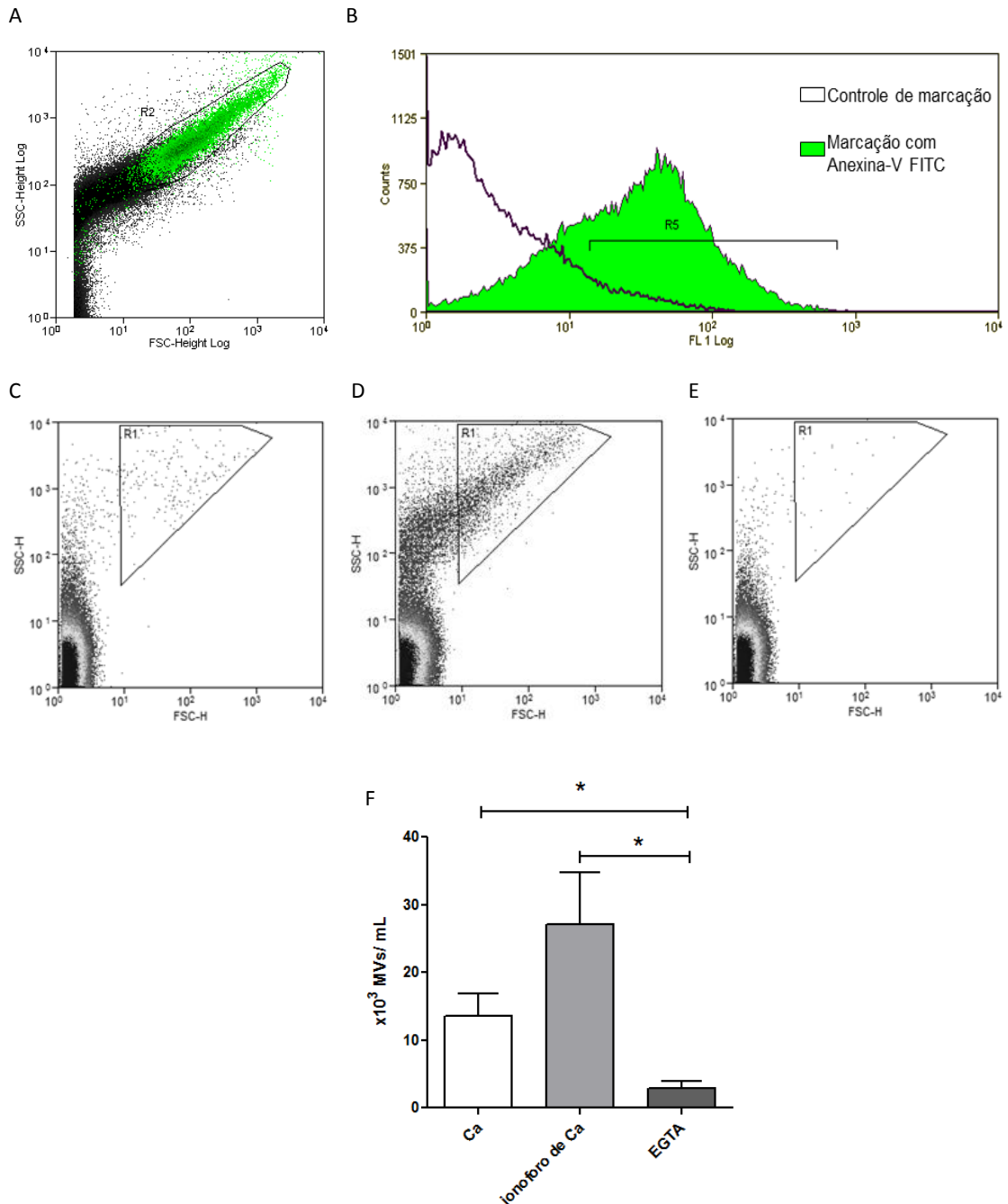


Figura 4.1. Análise por citometria de fluxo das MVs de *G.intestinalis*. As MVs foram quantificadas por citometria de fluxo (BD FACScalibur) em gráficos de tamanho e granulosidade (FSC x SSC). A análise de exposição de PS foi realizada com Anexina V conjugada a FITC num histograma de fluorescência em FL-1. (A) Gráfico FSCxSSC de MVs marcadas com anexina-V-FITC, a população de MVs com exposição de PS na superfície (em verde, R2) foram obtidas a partir de um histograma de fluorescência (B), como controle de marcação foram usadas MVs sem Anexina-V-FITC; (C) 1 mM CaCl₂; (D) 3 μM ionóforo de Cálcio A23187; (E) 5 mM EGTA; (F) Gráfico de liberação de MVs dependente de Ca²⁺. Os gráficos de citometria de fluxo são representativos de medições feitas em três experimentos independentes. O gráfico de barras representa a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes.

Conforme mostrado na Figura 4.1C, foi observado um aumento na indução de MVs na presença do íon e de ionóforo de cálcio (Figura 4.1D) quando comparadas com CaCl_2 (Figura 4.1C), ou com o quelante de cálcio EGTA (Figura 4.1E). Foi observada uma tendência ao aumento na liberação de MVs quando utilizado ionóforo de cálcio, mas sem ser estatisticamente significativo. No entanto, com o uso do quelante de Ca^{2+} foram observadas diminuições significativas na vesiculação do controle e com o uso do ionóforo (Figura 4.1.F).

Os resultados indicam que os trofozoítos de *G. intestinalis* produzem MVs de forma dependente de cálcio e que estas expõem PS na superfície.

4.2. A manutenção da estrutura da membrana plasmática é importante para a produção de MVs pelos trofozoítos

O envolvimento de microdomínios de membrana, ou *lipid rafts*, na liberação de vesículas extracelulares tem sido sugerido previamente na literatura (71,107,108). Para avaliar a participação dos *lipid rafts* na geração de MVs por trofozoítos de *G. intestinalis*, os parasitas foram tratados previamente com metil- β -ciclodextrina (M β CD), um agente que se liga especificamente ao colesterol, desorganizando a estrutura desta região da membrana plasmática (109). Após o tratamento, os parasitas foram incubados em meio contendo CaCl_2 durante 1 hora a 37 °C e foi avaliada a liberação de MVs no sobrenadante por estas células.

Como apresentado na figura 4.2, os ensaios de dose-dependência indicaram uma relação direta entre a quantidade de colesterol na membrana e a produção de MVs pelos trofozoítos. O tratamento dos parasitas com 2,5 mM M β CD resultou numa diminuição não significativa da média de produção de MVs de 31% em relação ao controle. No entanto, foram observadas diminuições estatisticamente significativas na produção de MVs usando maiores concentrações de M β CD. A média do número de MVs presentes no sobrenadante diminuiu 48% e 57,8 % em relação ao controle quando os trofozoítos foram incubados com 5 mM e 10 mM de M β CD, respectivamente.

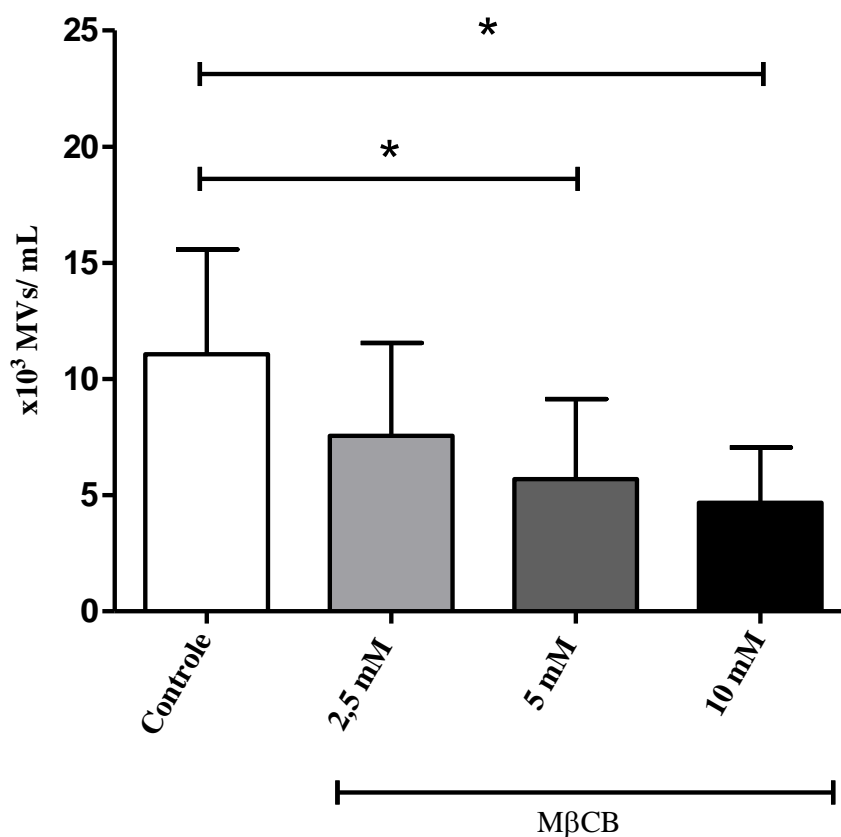


Figura 4.2. A extração do colesterol de membrana diminui a produção de MVs. Trofozoítos foram incubados com diferentes concentrações de MβCD durante uma hora. Seguidamente, procedeu-se à indução de MVs e quantificação das mesmas por citometria de fluxo. As medições foram feitas em triplicata, os resultados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. O test *t-student* foi utilizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Nossos resultados, em conformidade com outros descritos na literatura, indicam fortemente um papel dos *lipid rafts* na biogênese das MVs.

4.3. O crescimento dos trofozoítos e a liberação de MVs são dependentes do pH do meio.

Durante o ciclo de vida de *G. intestinalis*, o parasita é exposto a uma ampla faixa de condições fisiológicas, entre elas a acidez ou a alcalinidade ao longo do trato gastrointestinal humano (3). Confirmada a produção de MVs e considerando o aspecto acima mencionado, foi

analisado o crescimento (Figura 4.3A) e a liberação de MVs (Figura 4.3B) expondo os trofozoítos a condições de pH que simulam a passagem através do intestino delgado e grosso humano (110).

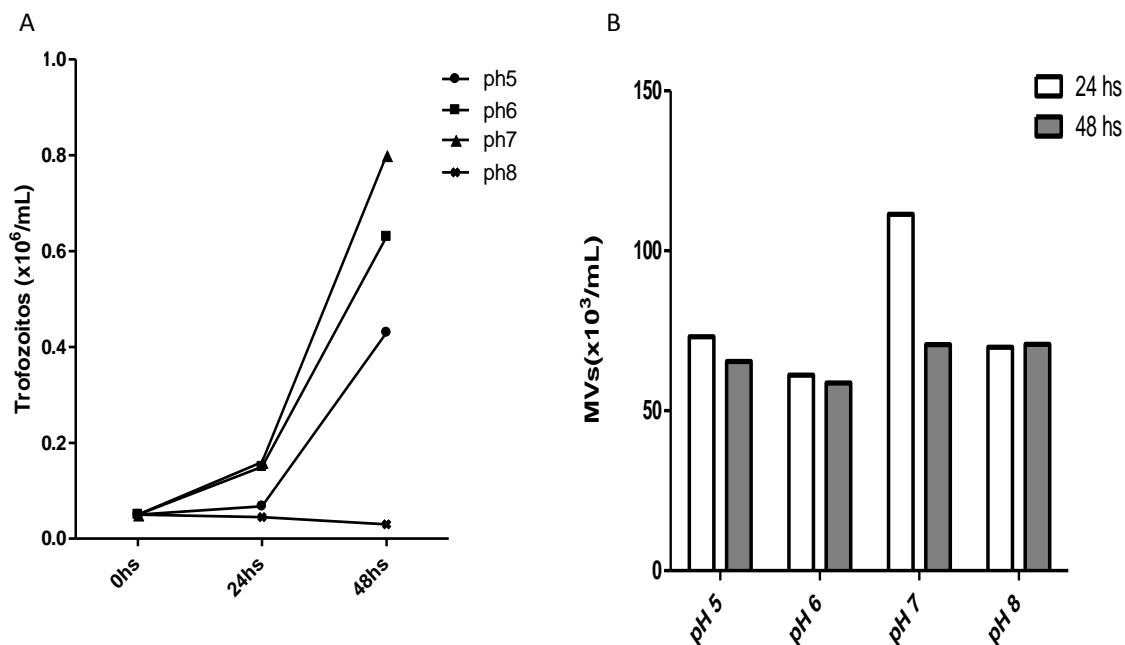


Figura 4.3. Crescimento de trofozoítos de *G. intestinalis* e produção de MVs em meios com diferentes pH. Um inóculo inicial contendo 5x10⁴/mL foi cultivado a 37°C durante 24 ou 48 horas em meios com diferentes valores de pH. Posteriormente os parasitas foram quantificados com câmara de Neubauer, ou através de citometria de fluxo no caso das MVs presentes no sobrenadante. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Concordantemente com trabalhos publicados, o meio com pH 7 foi o mais adequado para o crescimento *in vitro* dos trofozoítos. A maior quantidade de MVs presente no sobrenadante foi observada nas 24 horas a partir do estabelecimento da cultura no meio com este pH (Figura 4.3B).

4.4. Cinética da produção de MVs por trofozoítos de *G. intestinalis*

Uma vez confirmada a produção de MVs, analisamos a cinética de liberação de MVs através do tempo. Para estes experimentos, iniciamos um inóculo de 1x10⁶ trofozoítos que foram incubados em meio sem soro e na presença de CaCl₂. Os parasitas foram incubados a 37°C e a análise das MVs foi determinada no sobrenadante das culturas, após a centrifugação

para remoção das células e dos debrís celulares. Nosso resultado demonstra uma tendência de aumento na liberação das MVs ao longo do tempo de incubação (Figura 4.4). Esta liberação apresentou o ponto máximo em 120 min., seguido de um platô que sugere a capacidade máxima da cultura.

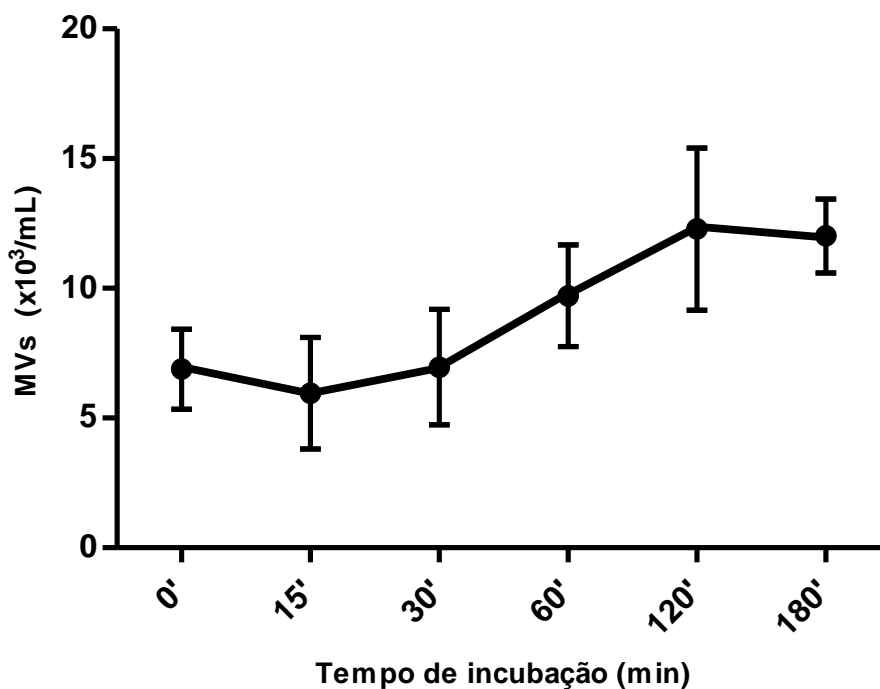


Figura 4.4. Cinética da produção de MVs por trofozoítos de *G. intestinalis*. A indução de microvesiculação foi realizada com CaCl_2 e a análise da liberação foi realizada em diferentes tempos de incubação. As MVs contidas no sobrenadante foram quantificadas por citometria de fluxo. O gráfico é representativo de medições feitas em triplicado, os resultados representam a média \pm o erro padrão de três experimentos independentes.

A mobilidade dos parasitas foi acompanhada através de microscopia, observando que estes permaneceram viáveis durante a realização do experimento.

4.5. Análise proteômica preliminar das MVs de *G. intestinalis*.

Para identificar as proteínas presentes nas MVs liberadas por trofozoítos, e comparar o seu conteúdo com MVs produzidas ao longo do ciclo de vida de *G. intestinalis* foi realizada uma análise inicial do proteoma de MVs liberadas por *G. intestinalis* em duas condições diferentes. Na primeira, foram isoladas MVs produzidas por trofozoítos como anteriormente descrito. Na segunda, foi induzido o encistamento *in vitro* de trofozoítos e 24 horas após foram isoladas as MVs presentes no sobrenadante. Nas duas condições, as culturas foram iniciadas com igual número de parasitas e MVs foram obtidas a partir de volumes iguais de meio de cultura.

As proteínas presentes nas MVs foram analisadas através do espectrômetro de massa nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX).

Foram encontradas um total de 8 proteínas pertencentes a *G. intestinalis* utilizando o banco de dados NCBI nr EST (Tabela 4.1). Além destas, foram encontradas outras proteínas que são apresentadas em tabelas no anexo.

As vesículas liberadas por trofozoítos apresentaram proteínas principalmente envolvidas no metabolismo de *G. intestinalis* como ornitina carbamoiltransferase (OCT), glucosamina-6-fosfato isomerase (Gln6PI) e arginina deiminase (ADI), além componentes do citoesqueleto como tubulinas alfa e beta.

Tabela 4.1. Análise qualitativa das proteínas presentes nas MVs de *G. intestinalis*

Amostra	Proteínas identificadas nas MVs isoladas	ID	Num. de peptídeos	% Cobertura
MV's isoladas de trofozoítos não induzidos ao encistamento	Ornitina carbamoiltransferase	gi 559178750	1	7,64499977
		gi 559177025	1	7,64499977
		gi 253747244	1	7,64499977
		gi 308161817	1	7,64499977
		gi 159119522	1	7,64499977
	Glucosamina-6-fosfato isomerase	gi 159117739	1	5,26299998
		gi 159117647	1	5,26299998
		gi 559176465	1	5,26299998
		gi 559176417	1	5,26299998

Continuação. Tabela 4.1. Análise qualitativa das proteínas presentes nas MVs de *G. intestinalis*

	Tubulina alfa	gi 559176773	2	6,84899985
		gi 559182287	2	7,59200006
		gi 209165431	2	7,65900015
		gi 159110970	2	7,70900026
		gi 26419569	2	7,97299966
		gi 559180706	2	11,0799998
	Arginina deiminase	gi 559175214	1	3,27600017
		gi 159111044	1	3,27600017
MV's isoladas de trofozoítos em encistamento (24hs)	Ornitina	gi 559177025	1	7,64499977
	carbamoiltransferase	gi 159119522	1	7,64499977
	Glucosamina-6-fosfato isomerase	gi 559176465	1	19,1699996
		gi 559176417	1	19,3900004
		gi 559179071	1	15,0999993
		gi 159117739	1	19,3900004
gi 159117647		1	19,1699996	
	Tubulina beta	gi 559173581	2	20,0399994
		gi 26419598	2	20,7800000
		gi 1027516	2	20,4500004
	VSP	gi 559173476	1	5,52500002
		gi 559176980	1	3,63599993
		gi 159119284	1	56,9800019
	Giardina alfa 7.1	gi 25140615	1	10,8499996
		gi 159107669	1	8,24699997
	Giardina alfa 7.2	gi 25140617	1	16,2699997
		gi 159107825	1	12,37
		gi 308158476	1	12,5300005
	Giardina alfa 7.3	gi 159116468	1	16,2699997
		gi 308158823	1	17,2700002

As análises aqui apresentadas foram feitas a partir de n=1.

Além de tubulinas e proteínas envolvidas no metabolismo (OCT, Gln6PI), a análise das vesículas liberadas por trofozoítos durante o processo de encistamento indicou a presença de proteínas variáveis específicas de superfície (VSP) e diferentes tipos de giardinas.

Esta análise preliminar sugere a possível ocorrência de uma modificação do conteúdo proteico das MVs liberadas de trofozoítos durante o processo de encistamento.

4.6. As MVs de trofozoítos de *G. intestinalis* carregam ácidos ribonucleicos.

É previamente descrito na literatura que as MVs podem carregar diferentes tipos de RNA, tanto mRNA e miRNA (111,112). Foi avaliada então a presença de RNAs nas MVs isoladas de trofozoítos de *G. intestinalis*. Para o ensaio, o RNA total foi extraído com Trizol a partir de MVs de trofozoítos de *G. intestinalis* ou de trofozoítos íntegros. Posteriormente, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Como apresentado na Figura 4.5, nas amostras de trofozoítos foram observadas 3 bandas (linha 3) correspondentes as espécies de rRNA 28S, 18S e 5,8S previamente reportadas na literatura com 2300, 1300 e 127 nucleotídeos, respectivamente (113). No entanto, nas amostras de MVs (linha 2) foi observada uma banda única de tamanho menor ao rRNA 5,8S.

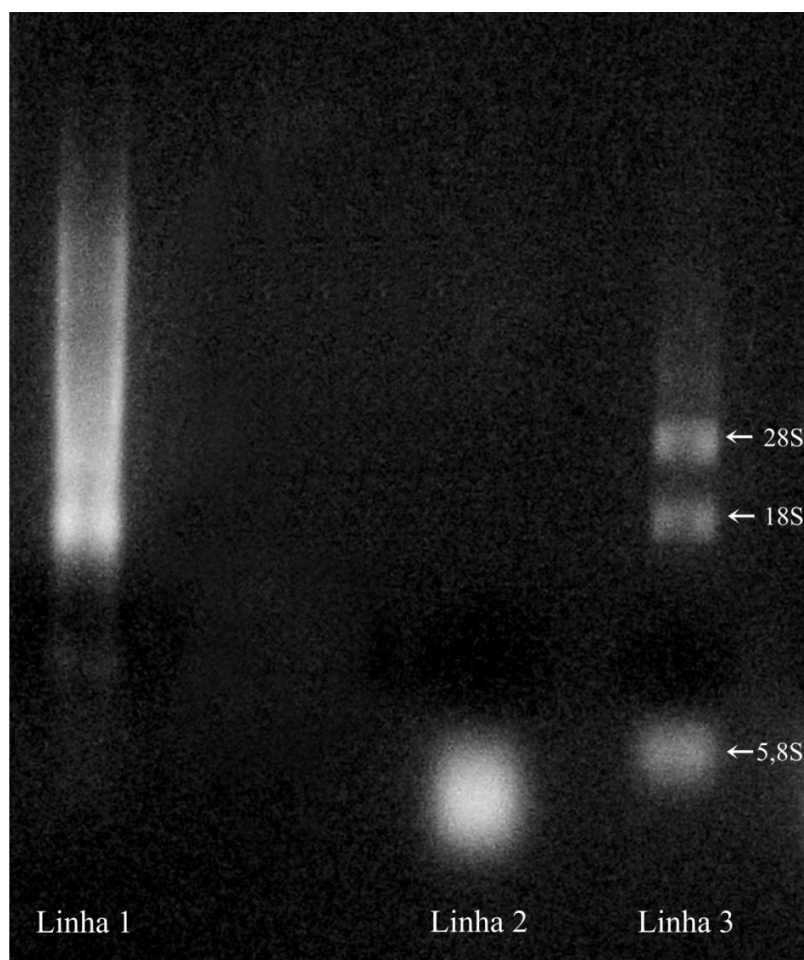


Figura 4.5. Gel de agarose a 1,5% com amostras de RNA de trofozoítos íntegros e de MVs isoladas. Linha 1: marcador molecular; linha 2: RNA isolado de MVs; linha 3: RNA isolado de trofozoítos íntegros.

Este resultado, em conjunto com os anteriores, indica que os trofozoítos de *G. intestinalis* liberam MVs e que estas carregam RNA de baixo peso molecular.

4.7. MVs de trofozoítos de G. intestinalis interagem com as células Caco-2.

Na literatura tem sido descrito por vários autores que as VEs depois de secretadas de suas células de origem podem interagir com outras células-alvo (114–116). Após ter estabelecido que os trofozoítos liberam MVs, foi considerada a hipótese de que as MVs poderiam interagir com as células hospedeiras.

Com o objetivo de avaliar a interação das MVs com as células hospedeiras, foram realizados ensaios de incubação utilizando MVs tratadas previamente com um marcador lipofílico fluorescente em culturas de células Caco-2. Após marcação com pKH26-red, as MVs (5µg) foram incubadas durante 30 min. sobre monocamadas de células Caco-2. Posteriormente, foram realizadas 2 lavagens com PBS para remover as MVs livres no meio. Imediatamente as células foram fixadas e analisadas por microscopia de fluorescência. Como apresentado nas figuras 4.6 A-C, foram observadas células Caco-2 marcadas com o corante fluorescente demonstrando que ocorre interação entre as MVs e a membrana da célula Caco-2.

Uma vez confirmado o processo de interação, foi avaliada a internalização das vesículas nas células Caco-2 como possível modo de interação destas estruturas com as células hospedeiras. Com este objetivo, foram realizados ensaios de interação pré tratando as células Caco-2 com citocalasina D (inibidor da fagocitose) com posterior incubação com MVs marcadas. No entanto, o uso desta substância não impediu a marcação da membrana das células Caco-2 quando incubadas com MVs marcadas com Pkh26. (Figuras 4.6 D-F)

Estes resultados proporcionam uma forte evidência de que as MVs de *G. intestinalis* podem interagir com as células Caco-2.

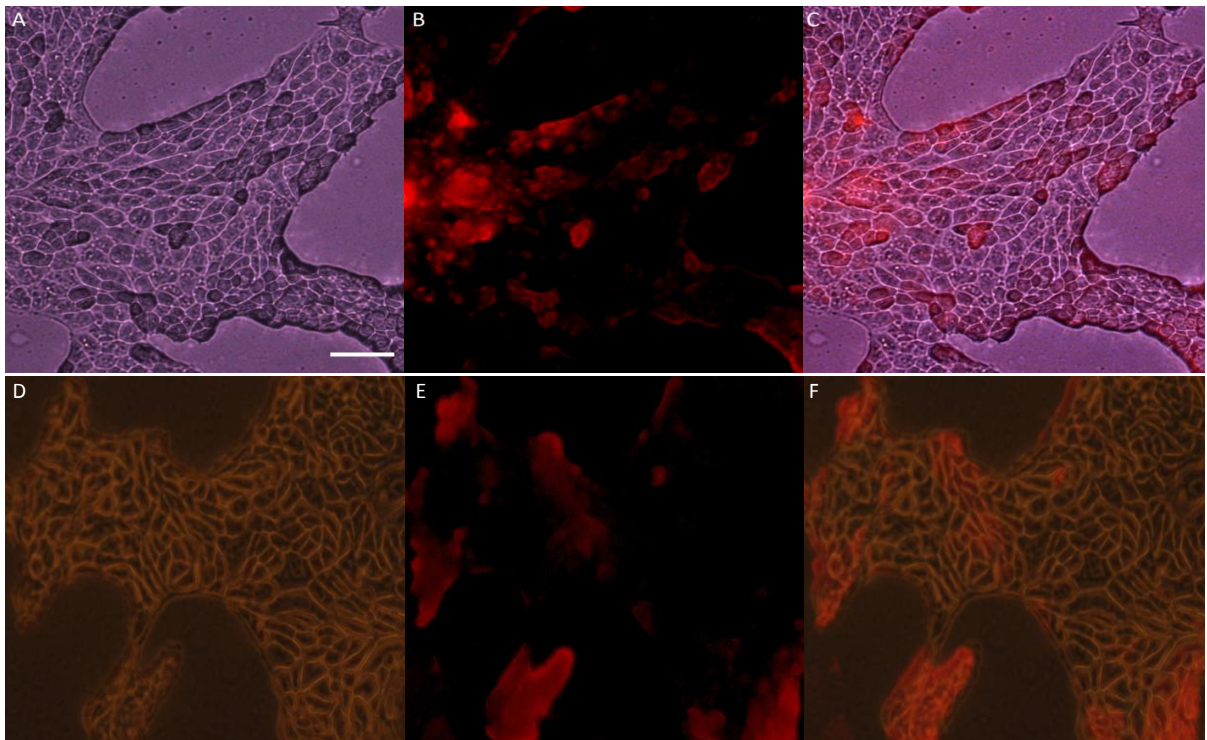


Figura 4.6. Interação de MVs de *G. intestinalis* com a membrana de células Caco-2. MVs isoladas por ultracentrifugação foram marcadas com PkH26 e incubadas com células Caco-2. Após fixação, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência. Em **A-C**, incubação de células Caco-2 com MVs durante 30 min. (A) Células Caco-2 observadas em campo claro; (B) Microscopia de fluorescência mostrando a marcação da membrana de Caco-2 com MVs tratadas com pKH26; (C) Sobreposição das imagens determinando a marcação apenas na membrana das células Caco-2. Em **D-F**, células Caco-2 pré-tratadas com citocalasina D e posteriormente incubadas com MVs marcadas. (D) Células observadas em campo claro; (E) Microscopia de fluorescência mostrando a marcação da membrana de Caco-2 com MVs tratadas com pKH26; (F) Sobreposição das imagens determinando a marcação apenas na membrana das células Caco-2. As imagens são representativas de duplicatas biológicas de dois experimentos independentes. Aumento de 400x. Barra de escala: 20 micras

4.8. As MVs de *G. intestinalis* modulam a proliferação de células Caco-2

Na literatura têm sido reportadas mudanças na maturação de células e efeitos tóxicos observados após a interação das MVs com células-alvo. Uma vez confirmada a interação das MVs com as células Caco-2, foi avaliado o possível efeito deste processo na proliferação celular.

Para este experimento, células Caco-2 foram incubadas com MVs isoladas de trofozoítos de *G. intestinalis* durante 24 h. Seguidamente a proliferação celular foi medida pelo ensaio de MTS. Como apresentado na figura 4.7, as doses utilizadas de MVs não tiveram efeitos negativos na viabilidade das células Caco-2. Dependendo da dose foi observado inclusive um aumento da proliferação celular.

Um aumento de 11,6% na proliferação celular foi observado incubando as células com a menor concentração de MVs, mas sem ser estatisticamente significativo. No entanto, foram observados aumentos significativos da proliferação quando as células Caco-2 foram tratadas com concentrações maiores de MVs. A proliferação apresentou o ponto máximo de 14,9% com a dose de 3µg de MVs, seguido de um platô quando as células foram incubadas com 5 µg de MVs (14,6%, não estatisticamente significativo quando comparado com a concentração de 3 µg de MVs).

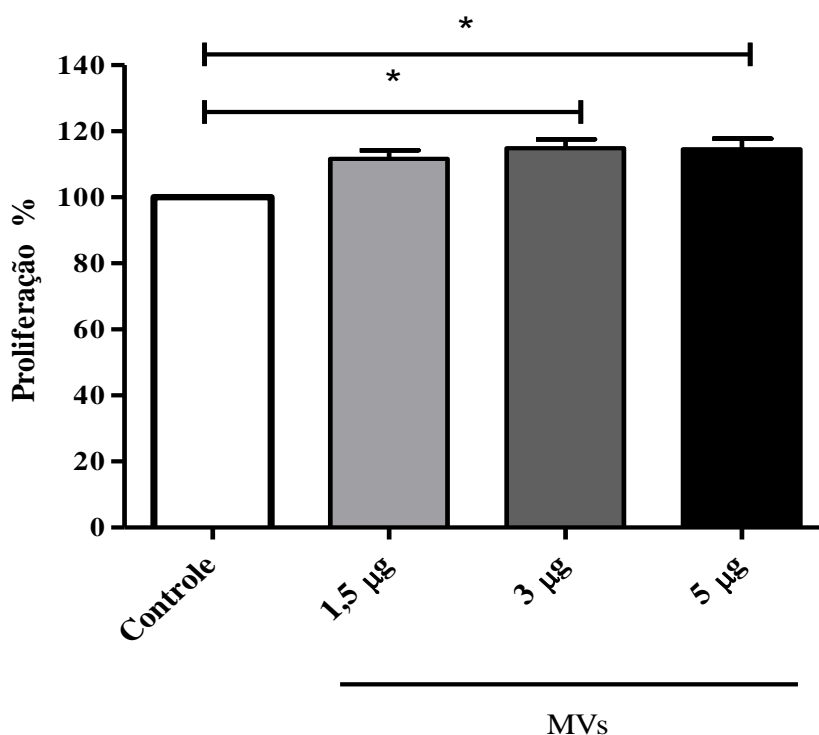


Figura 4.7. Efeito das MVs de *G. intestinalis* na proliferação celular. Células Caco-2 (5×10^3 células/poço) foram incubadas na presença de diferentes concentrações de MVs de trofozoítos de *G. intestinalis* durante 24 h. A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de MTS e os resultados são apresentados como porcentagens relativas às células não tratadas com MVs (controle). As medições foram feitas em triplicata, os resultados representam a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes. O teste ANOVA com múltiplas comparações foi realizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Os resultados sugerem uma relação entre a presença das MVs de *G. intestinalis* e um aumento da proliferação das células Caco-2. Os possíveis mecanismos de ação das MVs neste processo não são claros, mas presumimos que é necessária a interação entre MVs e células hospedeiras.

4.9. As MVs de G. intestinalis aumentam o número de trofozoítos aderidos às células hospedeiras.

Os trofozoítos de *G. intestinalis* dependem da aderência aos enterócitos do intestino delgado superior para evitar a eliminação peristáltica e estabelecer a infecção (1). Após a confirmação da interação das MVs com as células Caco-2, foi examinado se estas estruturas membranosas podem estar envolvidas no processo de aderência dos trofozoítos às células hospedeiras. Para este experimento, células Caco-2 em confluência foram incubadas simultaneamente com MVs previamente purificadas de *G. intestinalis* e formas trofozoítos do parasita. Como demonstrado na figura 4.8A, as incubações durante 1 hora com as concentrações de 3,5 µg e 7,0 µg de MVs resultaram numa tendência de aumento na média da adesão de 1,2 e 1,5 vezes, respectivamente. No entanto, tal acréscimo na adesão não foi estatisticamente significativo.

O aumento da interação do parasita na célula Caco-2 foi dependente do tempo de incubação, considerando que a média de parasitos aderidos aumentou após 3 horas (figura 4.8C) quando comparada com a incubação de 1 hora (Figura 4.8A). Ensaios de dose-dependência demonstraram uma relação direta entre a quantidade de MVs utilizada nos experimentos e a adesão do parasita à membrana da célula Caco-2. Concentrações de 7.0 µg de MVs após 3 horas de incubação foram suficientes para aumentar a adesão do parasita de forma estatisticamente significativa (2,4 vezes), um aumento de 1,5 vezes na adesão foi também observada quando utilizados 3,5 µg da mesma amostra, mas não de forma significativa.

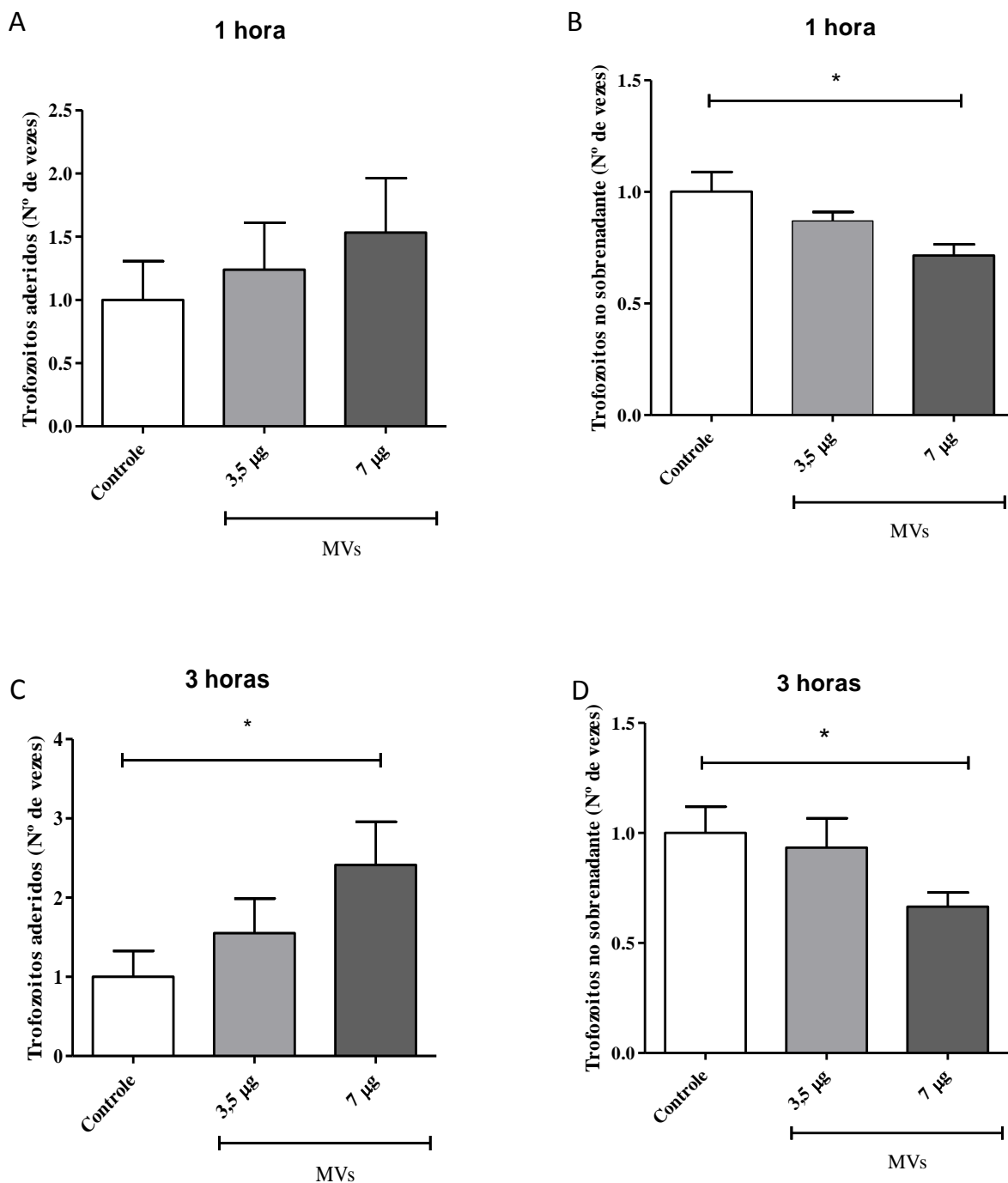


Figura 4.8. Adesão de trofozoítos à células hospedeiras na presença de MVs. Trofozoítos foram incubados durante 1 hora (A, B), ou 3 horas (C, D) com células Caco-2 em presença de concentrações diferentes de MVs previamente obtidos de trofozoítos. A quantidade de trofozoítos aderidos às células Caco-2 (A, C), e presentes no sobrenadante –não aderidos- (B, D) foi quantificado através da contagem com câmara de Neubauer e os resultados são apresentados como número de vezes do aumento da adesão em relação ao grupo controle. As condições foram testadas em duplicata. Os resultados representam a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes. O test *t-student* foi utilizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Concomitante ao aumento da adesão, o número de parasitas no sobrenadante foi diminuído de forma dependente da concentração de MVs tanto nas incubações de 1 hora quanto nas de 3 horas (Figuras 4.8.B e D, respectivamente). A incubação com 3,5 µg de MVs produziu uma leve diminuição na quantidade de parasitas no sobrenadante. No entanto, foi observada uma redução significativa dos trofozoítos no sobrenadante nas incubações com 7 µg de MVs. Estas observações reforçam o dado de adesão dos parasitas à membrana.

Os dados sugerem que as MVs do parasita podem aumentar a adesão dos trofozoítos participando no processo de colonização do hospedeiro.

4.10. A extração do colesterol da membrana plasmática dos trofozoítos reduz o número de parasitas aderidos às células Caco-2.

A adesão às células hospedeiras constitui-se um primeiro requisito essencial na infecção por parasitas. O processo pode ser mediado por *lipid rafts* do patógeno desde que estas regiões da membrana apresenta proteínas de adesão do parasita (75). Para avaliar o papel dos *lipid rafts* na adesão de *G. intestinalis* às células Caco-2, trofozoítos foram previamente tratados com diferentes concentrações MβCD durante 1 hora. Após tratamento, os trofozoítos foram incubados com células Caco-2 durante 2 horas e a adesão dos parasitas foi avaliada como descrito anteriormente.

Conforme ao incremento da dose de MβCD o número de trofozoítos aderidos diminuiu em comparação ao grupo controle (Figura 4.9)

Os resultados constituem uma demonstração do envolvimento de *lipid rafts* da membrana de *G. intestinalis* na adesão às células Caco-2.

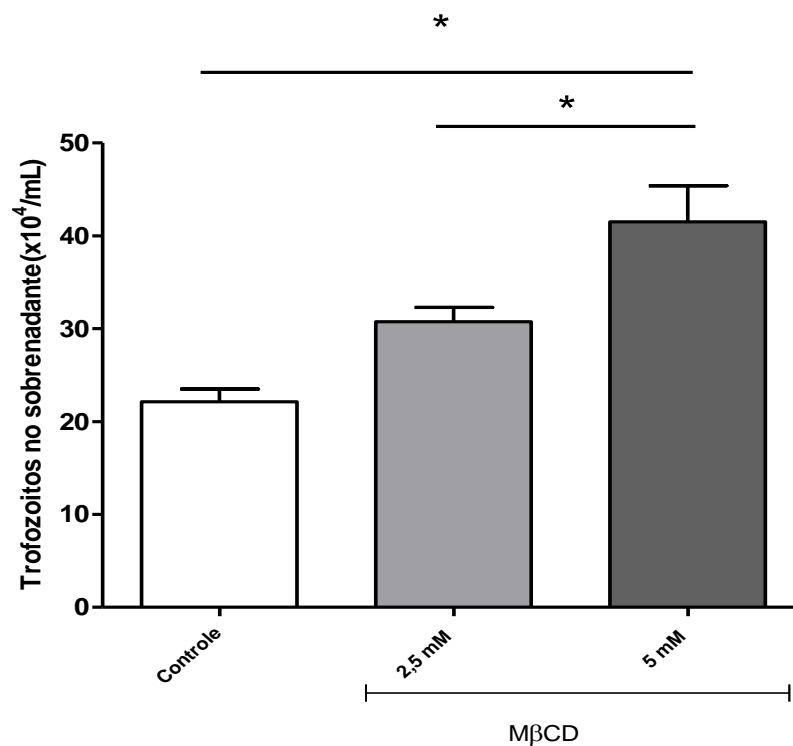


Figura 4.9. Trofozoítos tratados com MβCD e presentes no sobrenadante. Trofozoítos foram pré-tratados com diferentes doses de MβCD durante 1 hora, em seguida foram incubados com células Caco-2. Os trofozoítos presentes no sobrenadante foram quantificados com hemocítmetro. As condições foram testadas em duplicata. Os resultados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. O test *t-student* foi utilizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

V. DISCUSSÃO

Giardia intestinalis, o agente etiológico da giardíase, é descrito como o parasita mais comum que coloniza o intestino delgado de vertebrados, incluindo o ser humano. Têm sido estimadas 280 milhões de infecções humanas sintomáticas por ano (21) e em 2004 foi incluída como parte da Iniciativa de Doenças Negligenciadas da OMS (22). A doença é de distribuição mundial, mas é especialmente prevalente em crianças nos países em desenvolvimento (17) com manifestações clínicas que incluem principalmente diarreia aguda ou crônica (26). Adicionalmente, estudos recentes têm relacionado esta doença ao desenvolvimento de alterações gastrointestinais como síndrome do cólon irritável (23) e também com o déficit de crescimento em crianças (24). No Brasil, a prevalência de giardíase tem sido descrita como variável conforme a localidade e estudos coproparasitológicos demonstraram altos índices de infecção em regiões com infraestrutura urbana deficiente.

Apesar das consequências e da grande prevalência da doença em crianças, os mecanismos envolvidos na giardíase não são bem compreendidos e provavelmente a fisiopatologia seja devida a fatores múltiplos. Os trofozoítos não são invasivos e não é conhecida nenhuma toxina secretada por esta forma evolutiva (17). Os parasitas residentes no intestino delgado aderem às células epiteliais durante a colonização deste órgão, impedindo a absorção de nutrientes nesta região. A identificação de outros possíveis fatores atualmente não descritos é de fundamental importância na compreensão dos mecanismos envolvidos na doença.

Vários estudos indicam um importante papel para as VEs em processos fisiológicos e patofisiológicos. Tem sido demonstrada a participação destas estruturas na comunicação intercelular, coagulação, inflamação e processos oncogênicos. As vesículas extracelulares podem ser: microvesículas (MVs), usualmente maiores de 100 nm em diâmetro e derivadas da membrana plasmática; exosomas, pequenas vesículas (40-100 nm) originadas de membranas endossomais; e corpos apoptóticos, maiores de 1.5 µm contendo material nuclear.

Nos últimos anos tem sido descrito na literatura o envolvimento das vesículas extracelulares em processo de infecção por protozoários (Tabela 1.4). Estas estruturas de membrana podem interagir com as células do hospedeiro através da membrana plasmática ou ser internalizadas exercendo os efeitos no interior da célula hospedeira. Interessantemente, a interação das microvesículas com as células-alvo permite a transferência intercelular e

funcional de diversas moléculas como proteínas, lipídios e diferentes tipos de RNA. Adicionalmente, as VEs podem também exercer efeitos de longa distância como, por exemplo, em células do sistema imunitário do hospedeiro. A produção de vesículas extracelulares envolve microdomínios de membrana, exposição de PS na superfície e participação de proteínas como gelsolina e *flippases*.

Este estudo procurou identificar e caracterizar especificamente as MVs produzidas pelo parasita *G. intestinalis*, e sugere um papel para estas MVs na interação parasita/hospedeiro. Agentes indutores de liberação de MVs provocam principalmente um aumento no influxo de Ca^{2+} no interior da célula, resultando na inativação de enzimas como *flippases* e perda da assimetria de fosfolipídios na membrana plasmática com a exposição de PS no lado exterior da bicamada lipídica. Uma vez ocorridos estes eventos, as MVs são geradas por brotamento na membrana plasmática. Este processo está bem descrito e caracterizado em células de mamífero, mas os mecanismos envolvidos na liberação de MVs em parasitas não são bem compreendidos. Devido à facilidade de cultivo de trofozoítos de *G. intestinalis* e sua produção de MVs optamos por estudar este parasita como modelo para caracterizar a função das MVs liberadas por parasitas. Nossas análises por citometria de fluxo, junto com a marcação com Anexina-V-FITC permitiram observar que os trofozoítos de *G. intestinalis* liberam MVs. Como mencionado anteriormente, a citometria de fluxo tem limitações na resolução de estruturas inferiores de 200 nm, portanto não pode ser descartada a eventual presença de exossomos junto com as MVs nas vesículas liberadas pelo parasita. Em conformidade com estudos anteriores da literatura, foi também demonstrado que o processo é dependente da concentração de Ca^{2+} intracelular. O uso de ionóforos de cálcio permitiu estimular a liberação de MVs, entanto que a utilização de quelantes deste íon inibiram o processo.

Os *lipid rafts*, descritos como microdomínios de membrana enriquecidos em esfingolipídios e colesterol, estão envolvidos em vias de sinalização que regulam vários processos celulares, incluindo adesão, mobilidade, secreção e invasão (75). O envolvimento destes microdomínios de membrana na liberação de vesículas extracelulares tem sido sugerido previamente na literatura (71,107,108). Estudos em células monocíticas indicam uma relação entre o aumento do colesterol na membrana plasmática e uma maior produção de MVs (108). Outros estudos envolvendo o uso de substâncias que diminuem a concentração do colesterol nestes microdomínios têm demonstrado uma redução na produção de MVs (71,72). Nossos

resultados indicam a importância da manutenção da estrutura da membrana dos trofozoítos para que ocorra a liberação das MVs, o que sugere que a liberação de vesículas não é um processo aleatório. A sinalização através destes domínios poderia favorecer o processo, inclusive dando mais estabilidade às vesículas formadas, o que poderia também contribuir ao seu papel de agente sinalizador quando liberadas das células.

A adesão às células hospedeiras constitui-se um primeiro requisito essencial na infecção por parasitas. O processo pode ser mediado por *lipid rafts* do patógeno desde que estas regiões da membrana apresentem proteínas de adesão do parasita (75). Tem sido descrito na literatura a participação dos microdomínios de membrana na adesão de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (117,118) e no processo de infecção de *Leishmania (Viannia) braziliensis* à macrófagos (119)

Em 2011, Humen e colaboradores (120) demonstraram a participação dos *lipid rafts* do parasita na adesão às células hospedeiras. No entanto, a adesão não foi afetada quando as células hospedeiras foram pré tratadas com M β CD, demonstrando que os *lipid rafts* dos trofozoítos de *G. intestinalis*, e não das células hospedeiras, regulam o processo de adesão. Conforme estes autores, os nossos resultados dos ensaios de adesão de parasitas tratados com M β CD indicam o envolvimento de *lipid rafts* da membrana de *G. intestinalis* na adesão às células Caco-2.

Conforme descrito na literatura as moléculas contidas nas VEs (RNA e proteínas) podem regular várias vias celulares através da modulação da expressão gênica nas células-alvo. O uso deste tipo de vesículas por um parasita extracelular pode representar um método pelo qual o patógeno pode endereçar proteínas e/ou RNAs com capacidade de regular funções das células-alvo. O transporte de ácidos nucleicos em vesículas extracelulares poderia também proteger as moléculas de RNA de ribonucleases presentes no ambiente extracelular. Nossos resultados indicam a presença de RNAs de baixo peso molecular nas vesículas liberadas por *G. intestinalis*. Recentemente, foi sugerido que as moléculas de RNA contidas em exossomos liberados por *T. vaginalis* poderiam regular a resposta imune do hospedeiro (61). Interessantemente, a infecção em humanos por *G. intestinalis* caracteriza-se pela baixa inflamação da mucosa intestinal, sendo possível que o parasita regule negativamente a resposta inflamatória de maneira ativa através de produtos ainda desconhecidos. As moléculas

de RNA presentes nas MVs liberadas por trofozoítos poderiam apresentar um importante papel na interação do parasita com a célula-alvo, inclusive na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro.

A nossa análise da cinética de liberação de MVs pelos trofozoítos indicou que o processo é dependente do tempo apresentando um ponto máximo em 120 min. A produção de MVs pela membrana plasmática foi anteriormente descrita envolvendo o brotamento da vesícula, seguido de fissão da membrana, com a conseqüente liberação da estrutura no meio extracelular (74). Segundo Cocucci e colaboradores (2009), independentemente do tipo de estímulo aplicado às células, a geração de MVs ocorre a partir de um pequeno intervalo de tempo, e não de forma concomitante ao estímulo. Este tempo de liberação pode ser estimado entre umas poucas dezenas de segundos até 1-2 minutos (56). Durante o processo, pequenas porções da membrana plasmática são removidas. Em células em estado de repouso a remoção pode ser compensada pelo tráfego constitutivo de membrana. No entanto, nas células estimuladas a taxa de liberação supera o tráfego constitutivo sendo necessária uma compensação através da incorporação de nova membrana procedente do citoplasma para a superfície celular (121). Este mecanismo de renovação é feito através do processo de exocitose não secretora, que transfere a membrana e os componentes de organelas à superfície da célula (122)

O endereçamento de proteínas nas MVs é descrito como um processo seletivo. Proteínas específicas podem ser incluídas ou excluídas da membrana da MV em formação, produzindo a expressão de conjuntos de proteínas diferentes dos presentes na membrana das células a partir das quais as MVs foram formadas. Realizamos uma análise inicial do proteoma das MVs liberadas por *G. intestinalis* em duas condições diferentes. Na primeira, foram isoladas MVs produzidas por trofozoítos como anteriormente descrito. Na segunda, foi induzido o encistamento *in vitro* de trofozoítos e 24 horas após foram isoladas as MVs presentes no sobrenadante.

Em conformidade com outros trabalhos anteriormente descritos na literatura que indicaram a presença de componentes do citoesqueleto celular nas MVs, nossa análise proteômica inicial identificou tubulinas alfa e beta nas MVs liberadas por *G. intestinalis*.

O estudo das proteínas presentes nas vesículas liberadas por trofozoítos não induzidos ao processo de encistamento permitiu identificar as enzimas ADI e OCT. Estas enzimas foram previamente descritas como presentes em sobrenadantes de cultivos de trofozoítos (54) e encontram-se envolvidas com a degradação de arginina do meio extracelular como principal via de obtenção de energia. Durante esta reação metabólica, o aminoácido é convertido em citrulina e amônia pela enzima ADI, posteriormente em ornitina e carbamoil fosfato pela ação de OCT (1). Adicionalmente, a ornitina inibe a absorção de arginina por células do epitélio intestinal mas não por *G. intestinalis* (123). Como consequência, as células intestinais diminuem a produção de óxido nítrico (124), substância reportada como inibitória da proliferação de trofozoítos (45). A potencial presença de proteínas imunomoduladoras nas MVs produzidas por trofozoítos poderia sugerir o envolvimento destas estruturas de membrana interferindo em processos de imunidade inata durante o início da infecção e posterior sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Durante o encistamento, os trofozoítos experimentam uma diferenciação morfológica e molecular complexa (17). As VSPs cobrem a totalidade da superfície dos trofozoítos. Curiosamente, as análises de proteômica identificaram estas moléculas somente nas vesículas liberadas pelos trofozoítos em processo de encistamento. A ausência destas proteínas nas amostras de trofozoítos não induzidos ao encistamento não é clara e pode ser devido a um mecanismo de seleção de proteínas, descrito como frequente na biogênese das MVs em outros modelos. Svärd e colaboradores (1998) reportaram uma diminuição das VSPs na superfície do parasita durante o processo de encistamento. Eles observaram a internalização de grandes quantidades destas moléculas nas vesículas periféricas de tipo lisossomo, sugerindo a via endocítica como mecanismo envolvido na remoção das VSP da membrana durante o encistamento (125). No entanto, Papanastasiou e colaboradores (1996) tinham descrito que estas proteínas são encontradas também no meio de cultura. Os primeiros estudos envolvendo MVs indicaram que estas estruturas poderiam ser essenciais para remover proteínas transmembranares de forma específica (79). Desta forma, a eventual presença de VSPs nas vesículas liberadas por trofozoítos durante o processo de diferenciação poderia sugerir outra via de remoção destas moléculas de superfície, complementando a via endocítica.

Os componentes da parede do cisto são sintetizados a partir de glicose endógena através de vias induzíveis de 5 enzimas diferentes, entre elas a glucosamina-6-fosfato isomerase (Gln6PI). Esta enzima é expressa em baixos níveis durante todo o ciclo de vida do parasita mas a sua transcrição é estimulada durante o encistamento (1). A possível presença desta enzima nas MVs poderia indicar a participação destas estruturas no processo de encistamento.

Têm sido reportadas várias proteínas do citoesqueleto de *Giardia*, as predominantes são as tubulinas e giardinas. As proteínas denominadas alfa giardinas são moléculas de tipo anexina associadas à citoesqueleto e são encontradas exclusivamente em *Giardia* (126). Em conformidade com a literatura, a identificação destas proteínas nas MVs indica a presença de componentes do citoesqueleto nas vesículas extracelulares. Estas moléculas poderiam participar na manutenção da estrutura da vesícula extracelular.

O escasso número de proteínas de *G. intestinalis* identificadas nas MVs pode ser devido à metodologia utilizada que foi baseada na utilização de gel e posterior análise por espectrometria. Análises posteriores utilizando metodologias livres de gel – por exemplo *shotgun* – poderiam identificar um maior número de proteínas nas vesículas. Além disso, são necessárias análises de um maior número de amostras para que possamos obter um maior conhecimento das proteínas presentes nas MVs liberadas pelo parasita.

Os ensaios de microscopia de fluorescência sugeriram fortemente que as MVs isoladas de trofozoítos de *G. intestinalis* interagem com as células Caco-2. A linhagem celular Caco-2, originalmente obtida de um adenocarcinoma de cólon humano, é amplamente aceita como um modelo *in vitro* para infecções do trato intestinal superior (127). Depois de secretadas de suas células de origem, as MVs podem interagir com células alvo de diferentes modos: permanecendo associadas de forma estável à membrana plasmática, fusionando com ela ou sendo internalizadas através de diferentes vias endocíticas (56,82). Considerando-se que a orientação da membrana das vesículas extracelulares e das células intactas são as mesmas, as vesículas podem aderir às células hospedeiras através das mesmas interações moleculares envolvidas na fixação do próprio patógeno. Uma exposição estável e persistente destas estruturas pode ser esperada na superfície celular do hospedeiro, em especial em células com pouca ou nenhuma atividade endocítica (128).

As MVs de *G. intestinalis* poderiam estar interagindo através de uma associação estável com a membrana plasmática das células hospedeiras. Outros estudos têm demonstrado que as vesículas extracelulares podem fundir com a membrana plasmática de outras células: exosomas produzidos por *T. vaginalis* podem fundir com as células hospedeiras (61). Resultados anteriores de nosso grupo também demonstraram que MVs produzidas durante a interação de *T. cruzi* com monócitos são internalizadas por células Vero em preparação, e vesículas isoladas de helmintos são internalizadas nas células intestinais de *Rattus norvegicus* (94). Importaneamente, o uso de citocalasina D não impediu que as células Caco-2 se tornem fluorescentes em nossos ensaios. Esta observação sugere outras vias de interação distintas da fagocitose, seja através da ligação das vesículas com receptores de membrana plasmática, ou pela fusão das membranas tanto da MV quanto da célula hospedeira. A expressão de fosfolipídios carregados negativamente na superfície (por exemplo, PS) assim como a possível presença de diferentes moléculas de adesão nas MVs sugeriria que estas podem ser capazes de se ligar à células. No entanto, a fagocitose de um grupo de MVs não pode ser descartada. Análises por microscopia confocal permitiriam avaliar a possível fagocitose das MVs e os potenciais efeitos deste processo nas células hospedeiras.

Como discutido anteriormente, as enzimas ADI e OCT dos trofozoítos estão envolvidas no metabolismo de arginina para a obtenção de energia. A remoção deste aminoácido do meio extracelular através destas enzimas do parasita reduz a proliferação de células intestinais *in vitro* (123). Adicionalmente, têm sido reportadas mudanças na maturação e diferenciação de células induzidas por VEs. Baseados nestes dados da literatura, avaliamos a proliferação de células Caco-2 durante a interação com as MVs isoladas dos trofozoítos. Nossos resultados indicaram um aumento da proliferação das células hospedeiras na presença de MVs do parasita. Outros patógenos como *Bartonella bacilliformis* ou *Helicobacter pylori* podem promover a proliferação celular (129) e Ismail e colaboradores (2003) descreveram um aumento de 25 a 30% na proliferação de células de epitélio gástrico incubadas com MVs de *H. pylori* (87). Os possíveis mecanismos de ação das MVs de *G. intestinalis* sob o aumento da proliferação de células Caco-2 não são claros, mas presumimos que é necessária a interação entre MVs e células hospedeiras.

Foi observado também que as MVs de *G. intestinalis* aumentaram a adesão dos trofozoítos nas células Caco-2 *in vitro*. No momento de interagir com o epitélio intestinal, a maioria dos trofozoítos tem sido descritos com a superfície ventral em contato com as células do tecido. Em 1974, Holberton sugeriu que a adesão dos trofozoítos de *G. intestinalis* à mucosa do intestino é mediada por uma força de sucção gerada pelo disco adesivo presente na superfície ventral do parasita (130). Trabalhos mais recentes têm demonstrado que os trofozoítos podem aderir à célula hospedeira seguindo outra orientação, não necessariamente através da ventosa do disco ventral. Inge e colaboradores (1988) demonstraram que toda a superfície do parasita está envolvida no processo de adesão, sem necessariamente a exclusividade do disco ventral (131). Outro estudo de Sousa e colaboradores (2001) demonstraram ensaios experimentais em que as formas trofozoítas aparecem aderidas na célula hospedeira pela superfície dorsal (106).

O processo de adesão de *G. intestinalis* nas células hospedeiras é sugerido como multifatorial e além da participação do disco ventral, envolve a mobilidade dos flagelos, estruturas ventro-laterais e moléculas de superfície do parasita (2) entre elas lectinas e giardinas (52). Como é discutido por Ankarklev e colaboradores (2010), poucos fatores de virulência foram identificados em *Giardia* spp. Dentro deste contexto, as MVs aparecem como um mecanismo potencialmente mais efetivo para a concentração e eventual entrega de fatores de virulência às células hospedeiras (128).

As vesículas extracelulares têm sido descritas na literatura como participantes no processo infeccioso de parasitas como *Trypanosoma cruzi* (70), *Plasmodium falciparum* (59), *Leishmania* spp (60). Recentemente Twu e colaboradores (2013) demonstraram que exossomos de *T. vaginalis* medeiam as interações tanto parasita:parasita quanto parasita:célula hospedeira, além de desempenhar um papel na adesão do patógeno às células epiteliais (12). Um aspecto importante a ser considerado nos ensaios de adesão apresentados é que não pode ser descartada a eventual produção/secreção de MVs pelos parasitas durante a incubação com as células hospedeiras.

Considerados em conjunto, estes resultados indicam que as MVs de trofozoítos de *G.intestinalis* interagem com as células hospedeiras além de aumentarem a aderência dos parasitas nestas células *in vitro*. No entanto, os mecanismos envolvidos no aumento da adesão não são claros.

VEs têm sido isoladas de uma variedade de fluidos corporais incluindo sangue, fluido amniótico, saliva e urina (65). MVs de *G. intestinalis* poderiam potencialmente ser encontradas em fezes diarreicas de indivíduos infectados e desta forma servir como biomarcadores da infecção.

O conhecimento do conteúdo das MVs, a forma como estas estruturas incrementam a adesão do parasita nas células hospedeiras, assim como a possível modulação das células hospedeiras por estas estruturas poderá fornecer novo conhecimento sobre patogênese da giardíase, ajudar a estabelecer outras formas de diagnóstico e identificar alvos terapêuticos no combate da doença.

VI. CONCLUSÕES

- Trofozoítos de *G. intestinalis* liberam MVs de forma dependente de cálcio e com exposição de fosfatil serina na superfície.
- A produção de MVs apresentou uma tendência de aumento ao longo do tempo durante 120 min.
- Microdomínios de membrana (*lipid rafts*) encontram-se envolvidos na biogênese de MVs liberadas por trofozoítos e na adesão do parasita às células hospedeiras *in vitro*.
- As MVs liberadas por trofozoítos carregam RNA de baixo peso molecular.
- As MVs isoladas a partir de trofozoítos interagem com as células Caco-2 e aumentam a proliferação destas células.
- O número de trofozoítos aderidos às células Caco-2 aumenta em presença de MVs previamente isoladas do parasita.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jul;14(3):447–75.
2. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; 2010 Jun;8(6):413–22.
3. Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol*. 1996 Jan;50:679–705.
4. Cacciò SM, Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Aug;160(2):75–80.
5. Dobell C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proc R Soc Med*. 1920 Jan;13(Sect Hist Med):1–15.
6. Ford BJ. The Discovery of *Giardia* 1. *Microscope*. 2005;53(September 2004):147–53.
7. Blanchard R. Remarques sur le megastome intestinal. *Bull Soc Zool Fr*. 1888;13(18).
8. Stiles C. The type species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. *Zool Anz*. 1902;25(689).
9. Kofoid CA, Christensen EB. On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). *Univ Calif Publ Zool*. 1915;16:30–54.
10. Kofoid CA, Christensen ED. A critical review of the nomenclature of human intestinal flagellates. *Univ Calif Publ Zool*. 1920;20(160).
11. Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool*. 1952;57:53–146.
12. Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, et al. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 2003 Nov 13;426(6963):172–6.
13. Regoes A, Zourmpanou D, León-Avila G, van der Giezen M, Tovar J, Hehl AB. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30557–63.
14. Pimenta PF, da Silva PP, Nash T. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infect Immun*. 1991 Nov;59(11):3989–96.
15. Nash TE, Banks SM, Alling DW, Merritt JW, Conrad JT. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol*. 1990 Nov;71(4):415–21.
16. Nash TE. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997 Sep 29;352(1359):1369–75.
17. Adam RD. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev*. 1991 Dec;55(4):706–32.
18. Erlandsen SL, Macechko PT, van Keulen H, Jarroll EL. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J Eukaryot Microbiol*. 43(5):416–29.
19. Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, et al. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Jun;141(2):199–207.

20. RENDTORFF RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg.* 1954 Mar;59(2):209–20.
21. Lane S, Lloyd D. Current Trends in Research into the Waterborne Parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol.* Informa UK Ltd UK; 2002 Sep 29;28(2):123–47.
22. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends Parasitol.* 2006 May;22(5):203–8.
23. Morken MH, Valeur J, Norin E, Midtvedt T, Nysaeter G, Berstad A. Antibiotic or bacterial therapy in post-giardiasis irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol.* Informa UK Ltd London, UK; 2009 Jan 6;44(11):1296–303.
24. Robertson LJ, Hanevik K, Escobedo AA, Mørch K, Langeland N. Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol.* Elsevier; 2010 Feb 1;26(2):75–82.
25. WHO. The World Health Report. Fighting disease Fostering Development. Geneva; 1996.
26. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Jan;5(1):93–100.
27. Escobedo AA, Almirall P, Alfonso M, Cimerman S, Chacín-Bonilla L. Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread? *Acta Trop.* 2014 Apr;132:106–11.
28. Ekdahl K, Andersson Y. Imported giardiasis: impact of international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jun;72(6):825–30.
29. Chandra RK. The children of santa maria cauque: a prospective field study of health and growth: Leonardo J Mata. *Indian J Pediatr.* 1980 Jan;47(1):36–36.
30. Miotti PG, Gilman RH, Santosham M, Ryder RW, Yolken RH. Age-related rate of seropositivity of antibody to *Giardia lamblia* in four diverse populations. *J Clin Microbiol.* 1986 Dec;24(6):972–5.
31. Ferreira CS, Ferreira MU, Nogueira MR. The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in São Paulo, Brazil. *J Trop Med Hyg.* 1994 Apr;97(2):121–7.
32. Volotão a C, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão a, Peralta JM, Fernandes O. Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2007 Apr;102(1):10–9.
33. Santos CKS, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Aug;106(8):473–9.
34. Lima Junior OA de, Kaiser J, Catisti R. High occurrence of giardiasis in children living on a “landless farm workers” settlement in Araras, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2013 Jan;55(3):185–8.
35. Cardoso G de S, Santana ADC de, Aguiar CP de. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardiase em creches no município de Aracaju, SE, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* SBMT; 1995 Mar;28(1):25–31.

36. Ferreira CB, Marçal Junior O. Enteroparasitoses em escolares do Distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo piloto. *Rev Soc Bras Med Trop. SBMT*; 1997 Oct;30(5):373–7.
37. Quadros RM de, Marques S, Arruda AAR, Delfes PSWR, Medeiros IAA. [Intestinal parasites in nursery schools of Lages, southern Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37(5):422–3.
38. TIETZ MARQUES SM, BANDEIRA C, MARINHO DE QUADROS R. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. *Parasitol Latinoam. Sociedad Chilena de Parasitología. Organo Oficial de la Federación Latinoamericana de Parasitólogos*; 2005 Jun;60(1-2):78–81.
39. Goka AK, Rolston DD, Mathan VI, Farthing MJ. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(1):66–7.
40. Conboy G. Giardia. *Can Vet J.* 1997 Apr;38(4):245–7.
41. Vesey CJ, Peterson WL. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999 Jul;13(7):843–50.
42. Guy RA, Xiao C, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul 1;42(7):3317–20.
43. Verweij JJ, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen MAA, van Lieshout L, Polderman AM. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes.* 2003 Oct;17(5):223–5.
44. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. Giardia immunity--an update. *Trends Parasitol.* 2006 Jan;22(1):26–31.
45. Buret AG. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut.* 2007 Mar;56(3):316–7.
46. Panaro MA, Cianciulli A, Mitolo V, Mitolo CI, Acquafredda A, Brandonisio O, et al. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Nov;51(2):302–9.
47. Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG, et al. Strain-Dependent Induction of Enterocyte Apoptosis by *Giardia lamblia* Disrupts Epithelial Barrier Function in a Caspase-3-Dependent Manner. 2002;70(7):3673–80.
48. Troeger H, Epple H-J, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard G-D, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut.* 2007 Mar;56(3):328–35.
49. Scott KG-E, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP, Buret AG. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1179–90.
50. Scott KG-E, Yu LCH, Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun.* 2004 Jun;72(6):3536–42.
51. Farthing MJ. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997 Jan;24(1):79–88.

52. Weiland ME-L, Palm JED, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svärd SG. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol*. 2003 Oct;33(12):1341–51.
53. Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elías E V, Rivero FD, Saura A, et al. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved; 2008 Dec 11;456(7223):750–4.
54. Ringqvist E, Palm JED, Skarin H, Hehl AB, Weiland M, Davids BJ, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Jun;159(2):85–91.
55. Rodríguez-Fuentes GB, Cedillo-Rivera R, Fonseca-Liñán R, Argüello-García R, Muñoz O, Ortega-Pierres G, et al. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz*; 2006 Sep;101(6):693–6.
56. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009 Feb;19(2):43–51.
57. Dignat-George F, Freyssinet J-M, Key NS. Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets*. 2009 May;20(3):225–6; author reply 227–8.
58. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004 Oct;2(10):1842–51.
59. Faille D, Combes V, Mitchell AJ, Fontaine A, Juhan-Vague I, Alessi M-C, et al. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J*. 2009 Oct;23(10):3449–58.
60. Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci*. 2010 Mar 15;123(Pt 6):842–52.
61. Twu O, de Miguel N, Lustig G, Stevens GC, Vashisht A a., Wohlschlegel J a., et al. *Trichomonas vaginalis* Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions. Petri WA, editor. *PLoS Pathog*. 2013 Jul 11;9(7):e1003482.
62. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22.
63. Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):984–95.
64. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, et al. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One*. 2013 Jan;8(3):e58502.
65. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Aug;68(16):2667–88.
66. Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*. 2011 Sep;33(5):419–40.

67. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell vesicles*. 2013 Jan;2:1–25.
68. Van der Pol E, Hoekstra a G, Sturk a, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010 Dec;8(12):2596–607.
69. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18;200(4):373–83.
70. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. Trypanosoma cruzi immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol*. 2012 Feb 15;188(4):1942–52.
71. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López J a. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1604–11.
72. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol*. 2005 Nov;27(3):375–87.
73. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol*. Elsevier; 2008 May 1;18(5):199–209.
74. Müller G. Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012 Jan;5:247–82.
75. Goldston AM, Powell RR, Temesvari L a. Sink or swim: lipid rafts in parasite pathogenesis. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2012 Oct;28(10):417–26.
76. Khatua AK, Taylor HE, Hildreth JEK, Popik W. Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *J Virol*. 2009 Jan;83(2):512–21.
77. Li J, Liu K, Liu Y, Xu Y, Zhang F, Yang H, et al. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α -induced antiviral activity. *Nat Immunol*. 2013 Aug;14(8):793–803.
78. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):769–75.
79. Pol E Van Der, Bo AN. Classification , Functions , and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. 2012;64(3):676–705.
80. Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Apr 1;306(7):C621–33.
81. Vlassov A V, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2012 Jul;1820(7):940–8.
82. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18;200(4):373–83.

83. Barteneva NS, Maltsev N, Vorobjev IA. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Jan;3:49.
84. Ariza ME, Rivaller P, Glaser R, Chen M, Williams M V. Epstein-Barr virus encoded dUTPase containing exosomes modulate innate and adaptive immune responses in human dendritic cells and peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*. 2013 Jan;8(7):e69827.
85. Aqil M, Naqvi AR, Mallik S, Bandyopadhyay S, Maulik U, Jameel S. The HIV Nef protein modulates cellular and exosomal miRNA profiles in human monocytic cells. *J Extracell vesicles*. 2014 Jan;3:1–11.
86. Ramakrishnaiah V, Thumann C, Fofana I, Habersetzer F, Pan Q, de Ruiter PE, et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 6;110(32):13109–13.
87. Ismail S, Hampton MB, Keenan JI. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2003 Oct;71(10):5670–5.
88. Galka F, Wai SN, Kusch H, Engelmann S, Hecker M, Schmeck B, et al. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect Immun*. 2008 May;76(5):1825–36.
89. Singh PP, LeMaire C, Tan JC, Zeng E, Schorey JS. Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN- γ mediated activation of naïve macrophages. *PLoS One*. 2011 Jan;6(4):e18564.
90. Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD, Casadevall A, Rodrigues ML, Nimrichter L. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun*. 2010 Apr;78(4):1601–9.
91. Weber SS, Parente AFA, Borges CL, Parente JA, Bailão AM, de Almeida Soares CM. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides mycelia* and yeast cells. *PLoS One*. 2012 Jan;7(12):e52470.
92. Walker M, Baz A, Dematteis S, Stettler M, Gottstein B, Schaller J, et al. Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. *Infect Immun*. 2004 Jan;72(1):527–36.
93. Liégeois S, Benedetto A, Garnier J-M, Schwab Y, Labouesse M. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*. 2006 Jun 19;173(6):949–61.
94. Marcilla A, Trelis M, Cortés A, Sotillo J, Cantalapiedra F, Minguez MT, et al. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*. 2012 Jan;7(9):e45974.
95. Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect*. 2012 Dec;14(15):1465–74.
96. Cestari I, Ramirez MI. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. Gruner AC, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2010 Jan;5(3):e9721.
97. Mantel P-Y, Hoang AN, Goldowitz I, Potashnikova D, Hamza B, Vorobjev I, et al. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication

- within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*. 2013 May 15;13(5):521–34.
98. Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del Portillo HA. Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. Rénia L, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2011 Jan;6(10):e26588.
 99. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog*. 2010 Jan;6(1):e1000744.
 100. Campos FMF, Franklin BS, Teixeira-Carvalho A, Filho ALS, de Paula SCO, Fontes CJ, et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2010 Jan;9(1):327.
 101. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3234–44.
 102. Geiger A, Hirtz C, Bécue T, Bellard E, Centeno D, Gargani D, et al. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol*. 2010 Jan;10(1):20.
 103. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983 Jan;77(4):487–8.
 104. Kane A V, Ward HD, Keusch GT, Pereira ME. In vitro encystation of *Giardia lamblia*: large-scale production of in vitro cysts and strain and clone differences in encystation efficiency. *J Parasitol*. 1991 Dec;77(6):974–81.
 105. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov A V, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14440–5.
 106. Sousa MC, Gonçalves CA, Bairos VA, Poiars-Da-Silva J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Mar;8(2):258–65.
 107. De Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4336–44.
 108. Liu M-L, Reilly MP, Casasanto P, McKenzie SE, Williams KJ. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Feb;27(2):430–5.
 109. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun;1768(6):1311–24.
 110. Gillin FD, Boucher SE, Rossi SS, Reiner DS. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp Parasitol*. 1989 Aug;69(2):164–74.
 111. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654–9.

112. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006 May;20(5):847–56.
113. Edlind TD, Chakraborty PR. Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res*. 1987 Oct 12;15(19):7889–901.
114. Bang C, Thum T. Exosomes: New players in cell–cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(11):2060–4.
115. Ludwig A-K, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. Elsevier Ltd; 2012 Jan;44(1):11–5.
116. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. Elsevier B.V.; 2010 Sep 10;73(10):1907–20.
117. Laughlin RC, McGugan GC, Powell RR, Welter BH, Temesvari LA. Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5349–57.
118. Mittal K, Welter BH, Temesvari LA. *Entamoeba histolytica*: lipid rafts are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components. *Exp Parasitol*. 2008 Oct;120(2):127–34.
119. Yoneyama KAG, Tanaka AK, Silveira TG V, Takahashi HK, Straus AH. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *J Lipid Res*. 2006 Oct 1;47(10):2171–8.
120. Humen M a, Pérez PF, Liévin-Le Moal V. Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cell Microbiol*. 2011 Nov;13(11):1683–702.
121. Morris CE, Homann U. Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membr Biol*. 2001 Jan 15;179(2):79–102.
122. Chieriegatti E, Meldolesi J. Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):181–7.
123. Stadelmann B, Merino MC, Persson L, Svärd SG. Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2012 Jan;7(9):e45325.
124. Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, et al. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1478–87.
125. Svärd SG, Meng TC, Hetsko ML, McCaffery JM, Gillin FD. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*. 1998 Dec;30(5):979–89.
126. Lourenço D, Andrade IDS, Terra LL, Guimarães PR, Zingali RB, de Souza W. Proteomic analysis of the ventral disc of *Giardia lamblia*. *BMC Res Notes*. BioMed Central Ltd; 2012 Jan;5(1):41.

127. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005 Jan;21(1):1–26.
128. Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol.* 2011 Jan;13(1):1–9.
129. Tran Van Nhieu G, Arbibe L. Genetic reprogramming of host cells by bacterial pathogens. *F1000 Biol Rep.* 2009 Jan;1(October):80.
130. Holberton D V. Attachment of Giardia-a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J Exp Biol.* 1974 Feb;60(1):207–21.
131. Inge PM, Edson CM, Farthing MJ. Attachment of Giardia lamblia to rat intestinal epithelial cells. *Gut.* 1988 Jun;29(6):795–801.

VIII. ANEXOS.

Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos

N	Unused	Total	%Cov	%Cov(50)	%Cov(95)	Accession	Name	Species	Peptides(95%)
208	2	2	3,27600017	3,27600017	3,27600017	gi 559175214	Arginine deiminase [Giardia intestinalis] RecName: Full=Glucosamine-6-phosphate isomerase 1; AltName: Full=Glucosamine-6-phosphate deaminase 1; Short=GNPDA	Giardia intestinalis	1
214	1,92	2	5,26299998	5,26299998	5,26299998	gi 6831555	1; Short=GlcN6P deaminase 1 Glucosamine-6-phosphate isomerase	Giardia intestinalis	1
214	0	2	5,26299998	5,26299998	5,26299998	gi 559176465	[Giardia intestinalis] Glucosamine-6-phosphate isomerase	Giardia intestinalis	1
214	0	2	5,32299988	5,32299988	5,32299988	gi 559176417	[Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
118	0	3,51	6,84899986	6,84899986	6,84899986	gi 559176773	Tubulin alpha chain [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	2
118	0	3,51	7,59200007	7,59200007	7,59200007	gi 559182287	Tubulin alpha chain [Giardia intestinalis] Ornithine carbamoyltransferase [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	2
159	2,14	2,14	7,64499977	7,64499977	3,9760001	gi 559178750	Ornithine carbamoyltransferase [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
159	0	2,14	7,64499977	7,64499977	3,9760001	gi 559177025	intestinalis]	Giardia intestinalis	1
118	0	3,51	7,65900016	7,65900016	7,65900016	gi 209165431	alpha-tubulin [Giardia intestinalis] Alpha-tubulin [Giardia lamblia ATCC	Giardia intestinalis	2
118	0	3,51	7,70900026	7,70900026	7,70900026	gi 159110970	50803]	Giardia intestinalis	2
118	0	3,51	7,97299966	7,97299966	7,97299966	gi 26419569	alpha-tubulin [Giardia intestinalis] Tubulin alpha chain, partial [Giardia	Giardia intestinalis	2
118	0	3,51	11,0799998	11,0799998	11,0799998	gi 559180706	intestinalis] Ornithine carbamoyltransferase [Giardia	Giardia intestinalis	2
159	0	2,14	7,64499977	7,64499977	3,9760001	gi 253747244	intestinalis ATCC 50581] Arginine deiminase [Giardia lamblia ATCC	Giardia intestinalis ATCC 50581	1
208	0	2	3,27600017	3,27600017	3,27600017	gi 159111044	50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
214	0	2	5,26299998	5,26299998	5,26299998	gi 159117647	Glucosamine-6-phosphate deaminase	Giardia lamblia	1

[Giardia lamblia ATCC 50803]

ATCC 50803

Continuação. Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos

214	0	2	5,32299988	5,32299988	5,32299988	gi 159117739	Glucosamine-6-phosphate deaminase [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
159	0	2,14	7,64499977	7,64499977	3,9760001	gi 159119522	Ornithine carbamoyltransferase [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
159	0	2,14	7,64499977	7,64499977	3,9760001	gi 308161817	Ornithine carbamoyltransferase [Giardia lamblia P15]	Giardia lamblia P15	1
118	0	3,51	7,70900026	7,70900026	7,70900026	gi 308159161	Alpha-tubulin [Giardia lamblia P15]	Giardia lamblia P15	2
118	0	3,51	12,0300002	12,0300002	12,0300002	gi 308161456	Alpha-tubulin [Giardia lamblia P15]	Giardia lamblia P15	2
176	2	30,78	91,7200029	86,9000018	86,9000018	gi 294459613	hemoglobin beta [Bos indicus]	Bos frontalis frontalis	17
226	0,02	1,39	6,32499978	3,61399986	3,61399986	gi 164448683	L-lactate dehydrogenase C chain isoform 1 [Bos taurus]	Bos grunniens	1
226	0,02	1,39	6,32499978	3,61399986	3,61399986	gi 119371323	RecName: Full=L-lactate dehydrogenase A chain; Short=LDH-A	Bos grunniens	1
226	0	1,37	3,77399996	3,77399996	3,77399996	gi 156618419	lactate dehydrogenase C variant 3 [Bos grunniens]	Bos grunniens	1
202	0	2	8,70900005	4,20400016	4,20400016	gi 163866419	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Bos grunniens]	Bos grunniens	1
226	0	1,37	5,28599992	5,28599992	5,28599992	gi 381278315	lactate dehydrogenase C isoform transcript variant 2 [Bos grunniens]	Bos grunniens	1
226	0	1,41	11,9800001	5,98799996	3,59300002	gi 116282343	lactate dehydrogenase B [Bos grunniens]	Bos grunniens	1
226	0	1,5	14,6699995	8,68299976	3,59300002	gi 340400045	lactate dehydrogenase B-S [Bos grunniens]	Bos grunniens	1
226	0	1,5	14,6699995	8,68299976	3,59300002	gi 340400041	lactate dehydrogenase B-F [Bos grunniens]	Bos grunniens	1
226	0	1,5	14,6699995	8,68299976	3,59300002	gi 118572666	RecName: Full=L-lactate dehydrogenase B	Bos grunniens	1

							chain; Short=LDH-B		
226	0	1,5	14,6699995	8,68299976	3,59300002	gi 116282345	lactate dehydrogenase B variant 1	Bos grunniens	1
Continuação. Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos									
92	7,86	7,86	25,4200011	25,4200011	25,4200011	gi 555998232	PREDICTED: adiponectin [Bos mutus]	Bos grunniens	6
92	0	7,86	25,4200011	25,4200011	25,4200011	gi 549532543	adiponectin precursor [Bos grunniens] PREDICTED: hemoglobin subunit beta-like	Bos grunniens	6
117	0	26,73	70,3400016	65,5200005	65,5200005	gi 555992414	[Bos mutus]	Bos grunniens	13
139	0	77,41	71,8800008	71,8800008	59,5200002	gi 209973077	transferrin [Bos grunniens]	Bos grunniens	47
154	0	77,41	71,8800008	71,8800008	59,5200002	gi 209973077	transferrin [Bos grunniens]	Bos grunniens	47
117	0	28,76	85,5199993	80,6900024	80,6900024	gi 294459615	hemoglobin beta [Bos indicus]	Bos indicus	16
117	0	24,71	85,5199993	80,6900024	80,6900024	gi 294459621	hemoglobin beta [Bos javanicus]	Bos javanicus	14
176	0	24,71	85,5199993	80,6900024	80,6900024	gi 294459621	hemoglobin beta [Bos javanicus]	Bos javanicus Bos javanicus birmanicus x Bos	14
117	0	30,78	91,7200029	86,9000018	86,9000018	gi 294459611	hemoglobin beta [Bos indicus]	indicus Bos javanicus birmanicus x Bos	17
31	32,8	32,8	94,4800019	89,6600008	89,6600008	gi 294459577	hemoglobin beta [Bos taurus] PREDICTED: apolipoprotein B-100 [Bos	indicus	18
137	0	4,02	1,54999997	0,9389	0,9389	gi 555967548	mutus] Pyruvate kinase isozymes M1/M2, partial	Bos mutus	2
216	0	1,83	4,14500013	1,89999994	1,89999994	gi 440897502	[Bos mutus] PREDICTED: xaa-Pro dipeptidase isoform	Bos mutus	1
212	0	2	2,02799998	2,02799998	2,02799998	gi 555963802	X1 [Bos mutus]	Bos mutus	1
212	0	2	2,03300007	2,03300007	2,03300007	gi 440907515	Xaa-Pro dipeptidase, partial [Bos mutus] PREDICTED: fermitin family homolog 3	Bos mutus	1
221	0	1,75	2,97800004	2,03799997	2,03799997	gi 555964291	[Bos mutus] PREDICTED: pyruvate kinase PKM isoform	Bos mutus	1
216	0	1,83	4,4780001	2,05199998	2,05199998	gi 555987613	X1 [Bos mutus]	Bos mutus	1

216	0	1,83	4,52000014	2,07199994	2,07199994	gi 528961976	PREDICTED: pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform X3 [Bos taurus]	Bos mutus	1
Continuação. Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos									
229	0	1,31	2,07899995	2,07899995	2,07899995	gi 555968021	PREDICTED: lipopolysaccharide-binding protein-like [Bos mutus]	Bos mutus	1
212	0	2	2,21200008	2,21200008	2,21200008	gi 555963804	PREDICTED: xaa-Pro dipeptidase isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	1
212	0	2	2,33100001	2,33100001	2,33100001	gi 555963806	PREDICTED: xaa-Pro dipeptidase isoform X3 [Bos mutus]	Bos mutus	1
216	0	1,83	5,25199994	2,40700003	2,40700003	gi 555987619	PREDICTED: pyruvate kinase PKM isoform X4 [Bos mutus]	Bos mutus	1
226	0,02	1,39	5,81699982	3,32400016	3,32400016	gi 555977593	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase A chain isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	1
226	0,02	1,39	6,08699992	3,47799994	3,47799994	gi 440901988	L-lactate dehydrogenase C chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	1
226	0,02	1,39	6,32499978	3,61399986	3,61399986	gi 555977595	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase A chain isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	1
144	0	1,62	3,95999998	3,95999998	3,95999998	gi 555968476	PREDICTED: plasma serine protease inhibitor [Bos mutus]	Bos mutus	1
217	1,82	1,82	4,32900004	4,32900004	4,32900004	gi 555994879	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102270353 [Bos mutus]	Bos mutus	1
226	0	1,37	4,38000001	4,38000001	4,38000001	gi 555977589	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase C chain isoform X3 [Bos mutus]	Bos mutus	1
127	0	2,22	10,1800002	4,42500003	4,42500003	gi 555968460	PREDICTED: protein Z-dependent protease inhibitor [Bos mutus]	Bos mutus	2
165	0	2,02	21,48	4,44400012	4,44400012	gi 555999044	PREDICTED: complement factor H-like, partial [Bos mutus]	Bos mutus	1
206	0	2	4,66100015	4,66100015	4,66100015	gi 555957149	PREDICTED: retinol-binding protein 4 [Bos mutus]	Bos mutus	1
226	0,02	1,39	8,71400014	4,97899987	4,97899987	gi 555977601	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase A chain isoform X5 [Bos mutus]	Bos mutus	1

126	4,46	4,46	10,2499999	5,19100018	3,41500007	gi 555958185	PREDICTED: coagulation factor XIII A chain [Bos mutus]	Bos mutus	2
Continuação. Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos									
203	0	2	9,56500024	6,08699992	6,08699992	gi 440913296	14-3-3 protein zeta/delta, partial [Bos mutus]	Bos mutus	1
165	0	2,02	30,5299997	6,31600022	6,31600022	gi 440890656	hypothetical protein M91_01684, partial [Bos mutus]	Bos mutus	1
206	0	2	6,66700006	6,66700006	6,66700006	gi 440910269	Retinol-binding protein 4, partial [Bos mutus]	Bos mutus	1
146	0	1,36	18,75	7,03099966	7,03099966	gi 555966989	PREDICTED: serum amyloid A-4 protein-like isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	1
228	0	1,36	7,27799982	7,27799982	4,43000011	gi 555976818	PREDICTED: apolipoprotein E [Bos mutus]	Bos mutus	1
118	0	3,51	7,44699985	7,44699985	7,44699985	gi 555968848	PREDICTED: tubulin alpha-1C chain-like [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,72600025	7,72600025	7,72600025	gi 440911049	Tubulin alpha-1D chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,74300024	7,74300024	7,74300024	gi 555965429	PREDICTED: tubulin alpha-1C chain-like [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,74300024	7,74300024	7,74300024	gi 555955176	PREDICTED: tubulin alpha-1D chain-like [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,7610001	7,7610001	7,7610001	gi 555968846	PREDICTED: tubulin alpha-1A chain-like [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,7610001	7,7610001	7,7610001	gi 440905552	Tubulin alpha-1A chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,79500008	7,79500008	7,79500008	gi 555966439	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: tubulin alpha-8 chain [Bos mutus]	Bos mutus	2
118	0	3,51	7,82999992	7,82999992	7,82999992	gi 440905555	Tubulin alpha-1C chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
158	0	2,24	7,83300027	7,83300027	4,17799987	gi 555976638	PREDICTED: monocyte differentiation antigen CD14 [Bos mutus]	Bos mutus	1
158	0	2,24	7,87400007	7,87400007	4,19900008	gi 440902388	Monocyte differentiation antigen CD14,	Bos mutus	1

207	0	2	8,01900029	8,01900029	8,01900029	gi 440910283	partial [Bos mutus] Flavin reductase [Bos mutus]	Bos mutus	1
Continuação. Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos									
217	0	1,82	8,19699988	8,19699988	8,19699988	gi 440893975	hypothetical protein M91_13456, partial [Bos mutus]	Bos mutus	1
207	0	2	8,25200006	8,25200006	8,25200006	gi 555957040	PREDICTED: flavin reductase (NADPH) [Bos mutus]	Bos mutus	1
226	0	1,5	14,4999996	8,57999995	3,55000012	gi 440908101	L-lactate dehydrogenase B chain [Bos mutus]	Bos mutus	1
121	4,72	4,72	10,0699998	8,59299973	4,14800011	gi 555961878	PREDICTED: vitamin K-dependent protein S [Bos mutus]	Bos mutus	3
226	0	1,5	14,6699995	8,68299976	3,59300002	gi 555962409	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase B chain [Bos mutus]	Bos mutus	1
109	0	5,3	17,0100003	8,96599963	8,96599963	gi 555994901	PREDICTED: clusterin-like [Bos mutus]	Bos mutus	3
110	5,7	5,7	11,8100002	9,32900012	6,99699968	gi 555978853	PREDICTED: mannan-binding lectin serine protease 2 [Bos mutus]	Bos mutus	3
110	0	5,7	11,8100002	9,32900012	6,99699968	gi 440901448	Mannan-binding lectin serine protease 2, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
118	0	3,51	9,35800001	9,35800001	9,35800001	gi 440905554	hypothetical protein M91_03110, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
226	0	1,4	9,56899971	9,56899971	5,74200004	gi 555961008	PREDICTED: L-lactate dehydrogenase B chain-like [Bos mutus]	Bos mutus	1
149	0	2,93	12,06	9,92899984	7,56499991	gi 114050845	carboxypeptidase B2 precursor [Bos taurus]	Bos mutus	3
129	0	4,25	12,9899994	9,95699987	9,95699987	gi 529008606	PREDICTED: carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1 [Bos taurus]	Bos mutus	3
44	0	22,77	12,9700005	10,6299996	6,78299963	gi 555981040	PREDICTED: coagulation factor V [Bos mutus]	Bos mutus	13
44	0	22,77	12,9700005	10,6299996	6,78299963	gi 440900417	Coagulation factor V [Bos mutus]	Bos mutus	13
118	0	3,51	10,7699998	10,7699998	10,7699998	gi 440906892	hypothetical protein M91_04265, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2

149	2,93	2,93	13,2100001	10,8800001	8,29000026	gi 555969567	PREDICTED: carboxypeptidase B2 isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	3
Continuação. Tabela 8.1. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos									
111	5,61	5,61	18,8899994	10,8900003	10,8900003	gi 555998324	PREDICTED: tubulin beta-1 chain [Bos mutus]	Bos mutus	4
118	0	5,01	11,8699998	11,8699998	9,88999978	gi 555955172	PREDICTED: tubulin alpha-4A chain isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	3
118	0	5,01	12,0499998	12,0499998	10,0400001	gi 471376803	PREDICTED: tubulin alpha-4A chain [Trichechus manatus latirostris]	Bos mutus	3
118	0	5,01	12,0499998	12,0499998	10,0400001	gi 440911048	Tubulin alpha-4A chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
193	0	5,44	13,8600007	12,4399997	9,13399979	gi 440903405	Plasma kallikrein, partial [Bos mutus]	Bos mutus	4
83	9,95	9,97	23,9099994	12,6800001	10,4400001	gi 555969036	PREDICTED: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 [Bos mutus]	Bos mutus	5
118	0	3,51	12,8199995	12,8199995	12,8199995	gi 555968844	PREDICTED: tubulin alpha-1A chain-like, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
113	5,57	5,57	18,1299999	13,1200001	11,2499997	gi 555964677	PREDICTED: vitamin K-dependent protein C [Bos mutus]	Bos mutus	4
88	0	6,03	16,4900005	13,2799998	13,2799998	gi 440903122	Properdin, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
86	0	8,27	23,0299994	13,3300006	11,5199998	gi 555979016	PREDICTED: fibrinogen beta chain isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	5
88	0	6,03	16,5900007	13,3599997	13,3599997	gi 555974866	PREDICTED: properdin [Bos mutus]	Bos mutus	3
143	3,88	3,88	27,7799994	13,4499997	8,47999975	gi 555996837	PREDICTED: lumican [Bos mutus]	Bos mutus	2
193	2	5,44	14,9900004	13,4599999	9,88100022	gi 555974157	PREDICTED: plasma kallikrein [Bos mutus]	Bos mutus	4
86	0	8,27	23,2700005	13,47	11,6300002	gi 440901371	Fibrinogen beta chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	5
97	0	4,68	16,5099993	13,4900004	8,37199986	gi 555968462	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: corticosteroid-binding globulin [Bos mutus]	Bos mutus	2

Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após indução a encistamento

N	Unused	Total	%Cov	%Cov(50)	%Cov(95)	Accession	Name	Species	Peptides(95%)
119	0	4,61	20,0399995	11,0100001	7,04799965	gi 559173581	Tubulin beta chain [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	2
119	0	4,61	20,7800001	11,4200003	7,30599985	gi 26419598	beta-tubulin [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	2
119	0	4,61	20,4500005	11,2400003	7,19100013	gi 1027516	beta-tubulin [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	2
140	0	1,22	5,52500002	5,52500002	5,52500002	gi 559173476	Variant-specific surface protein, partial [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
155	0	2,43	16,2699997	9,49200019	4,06799987	gi 25140617	alpha-7.2 giardin [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
155	0	2,04	10,8499996	4,06799987	4,06799987	gi 25140615	alpha-7.1 giardin [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
163	2,14	2,14	19,1699997	14,2900005	9,0230003	gi 6831555	RecName: Full=Glucosamine-6-phosphate isomerase 1; AltName: Full=Glucosamine-6-phosphate deaminase 1; Short=GNPDA 1; Short=GlcN6P deaminase 1	Giardia intestinalis	1
163	0	2,14	19,1699997	14,2900005	9,0230003	gi 559176465	Glucosamine-6-phosphate isomerase [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
163	0	2,14	19,3900004	14,4500002	9,12500024	gi 559176417	Glucosamine-6-phosphate isomerase [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
163	0	2	15,0999993	9,79600027	9,79600027	gi 559179071	Glucosamine-6-phosphate isomerase, partial [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
180	2,01	2,01	7,64499977	5,19899987	5,19899987	gi 559177025	Ornithine carbamoyltransferase [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
210	1,96	2	3,63599993	3,63599993	3,63599993	gi 559176980	Variant-specific surface protein, partial [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
212	1,82	1,82	12,3400003	8,86100009	8,86100009	gi 559173641	Hypothetical protein DHA2_17153 [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	1
140	3,36	3,36	56,9800019	26,8299997	26,8299997	gi 159119284	VSP [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	2
155	0	2,43	16,2699997	9,49200019	4,06799987	gi 159116468	Alpha-7.3 giardin [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após indução a encistamento

155	0	2,43	12,37	7,21599981	3,09299994	gi 159107825	Alpha-7.2 giardin [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
155	0	2,04	8,24699998	3,09299994	3,09299994	gi 159107669	Alpha-7.1 giardin [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
163	0	2,14	19,3900004	14,4500002	9,12500024	gi 159117739	Glucosamine-6-phosphate deaminase [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
163	0	2,14	19,1699997	14,2900005	9,0230003	gi 159117647	Glucosamine-6-phosphate deaminase [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
180	0	2,01	7,64499977	5,19899987	5,19899987	gi 159119522	Ornithine carbamoyltransferase [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
210	0	2	29,1500002	29,1500002	29,1500002	gi 159119472	VSP [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
212	0	1,82	12,7000004	9,12100002	9,12100002	gi 159109675	Alpha-11 giardin [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	1
119	0	4,61	20,3600004	11,1900002	7,15899989	gi 159114295	Beta tubulin [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia P15	2
155	0	2,43	17,2700003	10,0699998	4,31700014	gi 308158823	Alpha-7.3 giardin [Giardia lamblia P15]	Giardia lamblia P15	1
155	0	2,43	12,5300005	7,31099993	3,13300006	gi 308158476	Alpha-7.2 giardin [Giardia lamblia P15]	Giardia lamblia P15	1
47	0	21,04	59,3800008	48,0100006	48,0100006	gi 311141816	beta-actin [Apodemus speciosus]	Apodemus speciosus	11
184	2	37,14	95,8599985	94,4800019	89,6600008	gi 294459613	hemoglobin beta [Bos indicus] RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein 1A; AltName: Full=Heat shock 70 kDa protein 1;	Bos frontalis frontalis	24
103	0	6,65	16,2200004	9,98400003	8,11199993	gi 56757663	Short=HSP70.1 RecName: Full=Heat shock 70 kDa protein 1B; AltName: Full=Heat shock 70 kDa protein 2;	Bos grunniens	4
103	0	6,64	14,2000005	9,98400003	8,11199993	gi 75077423	Short=HSP70.2	Bos grunniens	4

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após induzao a encistamento

149	2,71	2,71	19,1699997	14,17	10,0000001	gi 555998232	PREDICTED: adiponectin [Bos mutus]	Bos grunniens	2
149	0	2,71	19,1699997	14,17	10,0000001	gi 549532543	adiponectin precursor [Bos grunniens] PREDICTED: heat shock 70 kDa protein 1B-like isoform	Bos grunniens	2
103	0	6,65	16,2200004	9,98400003	8,11199993	gi 555998811	X2 [Bos mutus]	Bos indicus	4
103	0	6,65	16,2200004	9,98400003	8,11199993	gi 371767258	heat shock protein 70 [Bos indicus]	Bos indicus	4
103	0	6,52	14,35	8,11199993	8,11199993	gi 312064067	heat shock 70 kDa protein 1A [Bos indicus]	Bos indicus	4
103	0	6,51	12,3599999	8,13800022	8,13800022	gi 426207103	Heat Shock Protein 70, partial [Bos indicus]	Bos indicus	4
103	0	6,65	16,2200004	9,98400003	8,11199993	gi 40254806	heat shock 70 kDa protein 1A [Bos taurus]	Bos indicus x Bos taurus	4
184	0	28,78	89,6600008	88,2799983	83,4500015	gi 294459621	hemoglobin beta [Bos javanicus]	Bos javanicus	18
21	0	37,14	95,8599985	94,4800019	89,6600008	gi 294459611	hemoglobin beta [Bos indicus]	Bos javanicus birmanicus x Bos indicus	24
101	7,06	36,92	95,8599985	94,4800019	89,6600008	gi 294459577	hemoglobin beta [Bos taurus]	indicus	24
7	57,5	57,5	76,1300027	73,3299971	68,1699991	gi 555957525	PREDICTED: antithrombin-III [Bos mutus] PREDICTED: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain	Bos mutus	31
8	56,99	56,99	64,5200014	57,4199975	47,4900007	gi 555969034	H4 [Bos mutus]	Bos mutus	28
9	0	52,06	55,0599992	51,6900003	46,7500001	gi 555963521	PREDICTED: complement factor B [Bos mutus]	Bos mutus	27
11	49,88	49,88	70,1499999	67,7600026	66,4499998	gi 555990772	PREDICTED: hemopexin [Bos mutus]	Bos mutus	33
15	41,85	41,85	76,3700008	64,5600021	57,8100026	gi 555970195	PREDICTED: vitamin D-binding protein [Bos mutus]	Bos mutus	22
15	0	41,8	71,1600006	64,4200027	57,6799989	gi 440905005	Vitamin D-binding protein [Bos mutus]	Bos mutus	22
16	41,76	41,76	68,4899986	68,4899986	67,019999	gi 555989638	PREDICTED: angiotensinogen [Bos mutus]	Bos mutus	22
16	0	41,76	69,2099988	69,2099988	67,7299976	gi 440896555	Angiotensinogen, partial [Bos mutus]	Bos mutus	22
18	39,33	39,82	71,48	56,8899989	50,6600022	gi 555958371	PREDICTED: alpha-fetoprotein-like [Bos mutus]	Bos mutus	21
20	0	37,94	16,5700004	14,3999994	14,0100002	gi 555977771	PREDICTED: talin-1 [Bos mutus]	Bos mutus	19
20	0	37,94	16,4900005	14,3399999	13,9400005	gi 440901931	Talin-1, partial [Bos mutus]	Bos mutus	19

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após indução a encistamento

28	32,63	32,63	49,5099992	44,0299988	40,5099988	gi 555998220	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: histidine-rich glycoprotein [Bos mutus]	Bos mutus	16
35	29,68	29,68	46,3699996	43,3800012	39,5300001	gi 555958159	PREDICTED: factor XIIa inhibitor-like [Bos mutus]	Bos mutus	15
35	0	27,58	40,2799994	37,5200003	33,9899987	gi 440909830	Factor XIIa inhibitor, partial [Bos mutus]	Bos mutus	14
36	0	26,38	55,0800025	49,5900005	47,7600008	gi 555952235	PREDICTED: alpha-2-antiplasmin isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	15
37	0	25,64	59,740001	46,0500002	46,0500002	gi 555968337	PREDICTED: apolipoprotein A-IV [Bos mutus]	Bos mutus	15
38	0	29,52	33,0900013	26,85	23,15	gi 555967027	PREDICTED: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 [Bos mutus]	Bos mutus	14
38	0	29,52	32,9100013	26,7100006	23,0299994	gi 440906272	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2, partial [Bos mutus]	Bos mutus	14
43	0	22,93	29,0800005	25,97	22,2100005	gi 555955243	PREDICTED: complement component C6 [Bos mutus]	Bos mutus	12
44	0	23,78	50	39,7100002	33,1900001	gi 555991040	PREDICTED: vitronectin [Bos mutus]	Bos mutus	13
45	0,11	22,15	34,2200011	29,8000008	21,6299996	gi 555969038	PREDICTED: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 [Bos mutus]	Bos mutus	11
45	0,11	22,15	34,1399997	29,7399998	21,5900004	gi 440905495	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1, partial [Bos mutus]	Bos mutus	11
46	0	23,31	54,1800022	37,2900009	32,7800006	gi 555982977	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: complement component C8 beta chain [Bos mutus]	Bos mutus	14
46	0	23,31	55,2900016	38,0499989	33,4500015	gi 440899573	Complement component C8 beta chain [Bos mutus]	Bos mutus	14
47	0	23,05	56,4899981	46,3099986	46,3099986	gi 440913034	Actin, cytoplasmic 1 [Bos mutus]	Bos mutus	13
48	21,81	21,81	50,1399994	43,9099997	35,4099989	gi 555967989	PREDICTED: leucine-rich alpha-2-glycoprotein [Bos mutus]	Bos mutus	13
48	0	21,81	51,1600018	44,8000014	36,1299992	gi 440905931	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein [Bos mutus]	Bos mutus	13
54	0	16,37	39,8099989	22,8200004	17,1499997	gi 555968512	PREDICTED: complement factor I [Bos mutus]	Bos mutus	8
55	0	18	35,3399992	35,3399992	35,3399992	gi 440894706	Ig kappa chain C region [Bos mutus]	Bos mutus	10
58	17,47	17,47	29,7399998	28,4700006	28,4700006	gi 555983102	PREDICTED: carboxypeptidase N subunit 2 [Bos mutus]	Bos mutus	9
59	0	17,41	46,5799987	41,6799992	28,7699997	gi 555972005	PREDICTED: alpha-amylase 2B [Bos mutus]	Bos mutus	10

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após induzao a encistamento

61	16,71	16,73	42,9199994	35,3799999	30,1899999	gi 555969873	PREDICTED: coagulation factor IX isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	10
61	0	16,73	39,3900007	32,4699998	27,7099997	gi 555969871	PREDICTED: coagulation factor IX isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	10
62	0	14,23	33,3299994	27,8200001	22,3000005	gi 555994901	PREDICTED: clusterin-like [Bos mutus]	Bos mutus	8
65	0	15,52	37,2299999	31,0299993	26,7300001	gi 555974693	PREDICTED: thyroxine-binding globulin [Bos mutus]	Bos mutus	8
65	0	15,52	37,9599988	31,6300005	27,2500008	gi 440903183	Thyroxine-binding globulin [Bos mutus]	Bos mutus	8
66	15,49	15,49	51,2700021	40,8499986	38,5899991	gi 555996044	PREDICTED: serum paraoxonase/arylesterase 1 [Bos mutus]	Bos mutus	8
67	0	12,92	36,9800001	29,7699988	25,3500015	gi 555968462	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: corticosteroid-binding globulin [Bos mutus]	Bos mutus	6
67	0	12,92	39,3599987	31,6799998	26,9800007	gi 440905708	Corticosteroid-binding globulin [Bos mutus]	Bos mutus	6
68	14,57	14,57	10,17	6,78299963	5,22500016	gi 555981040	PREDICTED: coagulation factor V [Bos mutus]	Bos mutus	8
68	0	14,57	10,17	6,78299963	5,22500016	gi 440900417	Coagulation factor V [Bos mutus]	Bos mutus	8
70	13,62	13,62	5,72099984	3,42799984	2,70700008	gi 555967548	PREDICTED: apolipoprotein B-100 [Bos mutus]	Bos mutus	7
71	13,58	13,58	29,0600002	24,03	15,3999999	gi 555991548	PREDICTED: complement C1s subcomponent [Bos mutus]	Bos mutus	7
74	0	11,92	37,0900005	26,4299989	20,7000002	gi 555979018	PREDICTED: fibrinogen beta chain isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	8
74	0	11,92	36,5700006	26,0600001	20,3999996	gi 555979016	PREDICTED: fibrinogen beta chain isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	8
74	0	11,92	36,9399995	26,3300002	20,6100002	gi 440901371	Fibrinogen beta chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	8
75	11,45	11,45	48,2499987	33,3299994	23,3899996	gi 555996837	PREDICTED: lumican [Bos mutus]	Bos mutus	6
76	10,63	10,63	38,29	29,7500014	19,3000004	gi 555976818	PREDICTED: apolipoprotein E [Bos mutus]	Bos mutus	5
77	10,59	10,59	26,8900007	24,0600005	24,0600005	gi 555972799	PREDICTED: protein HP-25 homolog 1-like [Bos mutus]	Bos mutus	7
83	9,15	9,15	46,0399985	40,0999993	40,0999993	gi 555968261	PREDICTED: tetranectin [Bos mutus]	Bos mutus	6
85	0	8,39	29,1000009	29,1000009	29,1000009	gi 555986774	PREDICTED: complement C1q subcomponent subunit A isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	5
86	0	8,61	24,0799993	9,13399979	7,82900006	gi 555955241	PREDICTED: complement component C7 [Bos mutus]	Bos mutus	4

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após induzao a encistamento

86	0	8,61	24,1400003	9,15599987	7,84799978	gi 440911001	Complement component C7, partial [Bos mutus]	Bos mutus	4
87	0	7,96	38,4999999	25,3199995	16,7999998	gi 555998218	PREDICTED: fetuin-B [Bos mutus]	Bos mutus	5
88	0	7,75	11,75	6,97700009	4,47200015	gi 555954772	PREDICTED: complement C5-like [Bos mutus] PREDICTED: serum amyloid A-4 protein-like isoform X1	Bos mutus	4
92	0	7,82	62,0199978	57,3599994	51,1600018	gi 555966987	[Bos mutus] PREDICTED: serum amyloid A-4 protein-like isoform X2	Bos mutus	4
92	0	5,71	53,9099991	49,2199987	42,9699987	gi 555966989	[Bos mutus] PREDICTED: extracellular matrix protein 1 isoform X1	Bos mutus	3
93	0	7,66	30,0199986	22,4700004	9,39199999	gi 555965815	[Bos mutus] PREDICTED: mannose-binding protein C-like [Bos	Bos mutus	4
95	7,62	7,62	26,5100002	26,5100002	20,0800002	gi 555955436	mutus]	Bos mutus	5
96	7,39	7,39	42,7899987	27,9100001	27,9100001	gi 555972797	PREDICTED: protein HP-25 homolog 2-like [Bos mutus]	Bos mutus	5
98	0	5,12	32,6700002	24,7500002	24,2599994	gi 555978416	PREDICTED: alpha-1-acid glycoprotein-like [Bos mutus]	Bos mutus	3
99	0	5,04	17,8599998	8,30200016	3,39599997	gi 555979030	PREDICTED: fibrinogen alpha chain [Bos mutus]	Bos mutus	2
99	0	5,04	18,2999998	8,50500017	3,47900018	gi 440901372	Fibrinogen alpha chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
100	0	7,07	28,3899993	24,0400001	15,8600003	gi 555961329	PREDICTED: alpha-enolase isoform X3 [Bos mutus]	Bos mutus	4
100	0	7,07	25,5800009	21,6600001	14,2900005	gi 555961327	PREDICTED: alpha-enolase isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	4
100	0	4,95	24,3100002	18,2899997	10,8800001	gi 440908550	Alpha-enolase [Bos mutus]	Bos mutus	3
102	6,94	6,94	52,8699994	42,6800013	42,6800013	gi 32401410	immunoglobulin J chain precursor [Bos taurus] PREDICTED: heat shock 70 kDa protein 1B-like isoform	Bos mutus	4
103	0	4,5	13,7099996	7,47700036	5,60699999	gi 555998809	X1 [Bos mutus]	Bos mutus	3
103	0	4,5	13,6600003	7,4529998	5,59	gi 440890987	Heat shock 70 kDa protein 1B [Bos mutus] PREDICTED: hepatitis A virus cellular receptor 1-like	Bos mutus	3
104	6,37	6,37	48,8499999	41,9800013	34,3499988	gi 555981527	[Bos mutus]	Bos mutus	3
107	0	4,01	37,9900008	20,1100007	20,1100007	gi 440901679	Transthyretin [Bos mutus] PREDICTED: hemoglobin subunit alpha-like [Bos	Bos mutus	2
108	0	15,72	74,6500015	74,6500015	74,6500015	gi 555949397	mutus] PREDICTED: complement component C8 gamma chain	Bos mutus	10
109	0	4	25,2499998	17,8200006	17,8200006	gi 555949856	[Bos mutus]	Bos mutus	2

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após indução a encistamento

109	0	4	25,6300002	18,0899993	18,0899993	gi 440913241	Complement component C8 gamma chain, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
							PREDICTED: phosphatidylcholine-sterol		
111	0	5,23	23,1800005	14,7699997	9,77300033	gi 555969128	acyltransferase [Bos mutus]	Bos mutus	3
112	0	32,82	37,0400012	33,6600006	32,3700011	gi 555998222	PREDICTED: kininogen-1 isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	16
112	0	32,82	35,83	32,5500011	31,310001	gi 440891699	Kininogen-1 [Bos mutus]	Bos mutus	16
112	0	30,66	50	45,1799989	43,3499992	gi 555998224	PREDICTED: kininogen-1 isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	15
							PREDICTED: complement C1q subcomponent subunit B [Bos mutus]		
113	5,54	5,54	19,8400006	19,8400006	14,17	gi 555986772	Complement C1q subcomponent subunit B, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
113	0	5,54	19,7600007	19,7600007	14,1100004	gi 440897851	PREDICTED: tubulin beta-1 chain [Bos mutus]	Bos mutus	3
114	5,39	5,39	21,7800006	21,7800006	11,7799997	gi 555998324	PREDICTED: triosephosphate isomerase [Bos mutus]	Bos mutus	3
115	0	5,33	23,0800003	23,0800003	18,5299993	gi 555991526	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: deleted in malignant brain tumors 1, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
117	4,88	4,88	6,61199987	6,61199987	6,61199987	gi 555956153	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102270178 [Bos mutus]	Bos mutus	2
120	0	4,53	14,0300006	11,9400002	9,25400034	gi 555999562	PREDICTED: alpha-2-macroglobulin [Bos mutus]	Bos mutus	72
121	4,37	124,05	67,7699983	61,0199988	55,5899978	gi 555973039	Alpha-2-macroglobulin, partial [Bos mutus]	Bos mutus	72
121	0	124,05	67,9899991	61,2200022	55,7799995	gi 440903847	PREDICTED: mannan-binding lectin serine protease 2 [Bos mutus]	Bos mutus	2
123	4,32	4,32	9,91299972	8,89199972	5,10200001	gi 555978853	Mannan-binding lectin serine protease 2, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
123	0	4,32	9,91299972	8,89199972	5,10200001	gi 440901448	PREDICTED: protein HP-20 homolog [Bos mutus]	Bos mutus	2
124	4,28	4,28	36,4499986	24,6299997	17,2399998	gi 555972795	Protein HP-20-like protein, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
124	0	4,28	39,1499996	26,4600009	18,5200006	gi 440903967		Bos mutus	2

Continuação. Tabela 8.2. Proteínas identificadas nas amostras de MVs isoladas de trofozoítos 24 horas após indução a encistamento

125	0	4,09	22,9800001	22,9800001	18,2799995	gi 555976638	PREDICTED: monocyte differentiation antigen CD14 [Bos mutus]	Bos mutus	3
125	0	4,09	23,1000006	23,1000006	18,3699995	gi 440902388	Monocyte differentiation antigen CD14, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
126	0	4,05	29,7199994	14,1499996	14,1499996	gi 440909038	Transgelin-2, partial [Bos mutus]	Bos mutus	2
127	4,01	16,27	44,8900014	39,7799999	39,7799999	gi 555979456	PREDICTED: immunoglobulin lambda-like polypeptide 5-like, partial [Bos mutus]	Bos mutus	10
127	0	11	89,5200014	76,1900008	76,1900008	gi 440901185	Ig lambda-1 chain C regions, partial [Bos mutus]	Bos mutus	6
129	0	99,64	81,6799998	81,3899994	73,8600016	gi 555992244	PREDICTED: serotransferrin isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	65
129	0	97,64	80,0899982	79,7999978	72,2599983	gi 555992246	PREDICTED: serotransferrin isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	64
133	0	3,9	30,5099994	30,5099994	30,5099994	gi 555958381	PREDICTED: platelet factor 4-like [Bos mutus]	Bos mutus	2
134	0	3,87	11,1100003	9,95000005	9,95000005	gi 555985588	PREDICTED: coagulation factor XII isoform X2 [Bos mutus]	Bos mutus	3
134	0	3,87	10,9499998	9,80399996	9,80399996	gi 555985586	PREDICTED: coagulation factor XII isoform X1 [Bos mutus]	Bos mutus	3
134	0	3,87	11,2599999	10,08	10,08	gi 440898369	Coagulation factor XII, partial [Bos mutus]	Bos mutus	3
135	0	1,65	24,0500003	18,9899996	13,9200002	gi 555995097	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative V-set and immunoglobulin domain-containing-like protein IGHV4OR15-8-like [Bos mutus]	Bos mutus	1
136	0	3,81	3,9450001	2,69000009	1,43499998	gi 440891551	Complement C3 [Bos mutus]	Bos mutus	2