

Letícia Labati Terra

O citoesqueleto de *Giardia lamblia*: efeito do
herbicida orizalina, organização estrutural e
composição protéica do disco ventral

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas
(Biofísica)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Labati-Terra, Letícia

O Citoesqueleto de *Giardia lamblia*: efeito do herbicida orizalina, organização estrutural e composição protéica do disco ventral

Dissertação de tese: Mestre em Ciências Bioógicas – Biofísica

1. *Giardia lamblia* 2. Citoesqueleto 3. Disco ventral

- I. Universidade Federal do Rio de Janeiro
- II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

O citoesqueleto de *Giardia lamblia*: efeito do herbicida orizalina,
organização estrutural e composição protéica do disco ventral

Letícia Labati Terra

Orientador:
Wanderley de Souza

Rio de Janeiro, RJ
2008

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Wanderley de Souza, no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, PRONEX e FAPERJ.

Dedico essa dissertação aos meus pais, Clésio e Márcia, verdadeiros amigos, que sempre me apoiaram em todos os caminhos da minha vida. Mesmo longe, com todas as dificuldades que só nós conhecemos, vocês sempre estiveram comigo. Não tenho palavras para agradecer.

Ao Julio, namorado, companheiro, amigo... você faz parte de tudo que conquisto e de tudo que ainda vamos conquistar. Juntos.

AGRADECIMENTOS

- À minha família: tudo que conquistei devo a ela!
- Ao Julio, namorado e amigo, que sempre estava lá, na medida certa!
- Ao prof. Wanderley por todas as idéias.
- À Loraine que me recebeu de braços abertos quando cheguei ao laboratório. Além de todos ensinamentos, nunca esquecerei as brincadeiras e o amor pela ciência que ela tem. É um exemplo pra mim, pessoal e profissional; minha eterna “mamy”. Obrigada.
- Ao Celso...por tudo mesmo! Uma pessoa maravilhosa, pronto pra ajudar qualquer um, em qualquer hora. Como esquecer da sua orelha gostosa de apertar, das suas “jeguisse”, dos momentos engraçados, dos filmes no computador da Loraine (os melhores, clássicos!) e das conversas e conselhos intermináveis! A vida nunca seria a mesma sem você. Obrigada.
- À Mariana Carvalhaes (FOF’s), uma amizade que começou ali no laboratório e se mostrou eterna. Cúmplice e amiga; uma das pessoas mais esplendidas que conheço, com uma sinceridade ímpar. A sua presença sempre foi um conforto pra mim, mesmo quando você não estava mais lá. Isso tudo é seu também.
- À Daniela, mulher maluca, com narizinho empinado, ciumenta *corrigível* sim...e maravilhosa, em todos os sentidos. Sempre se superando. Mesmo com nossas diferenças foi incrível como nos aproximamos e confiamos uma na outra. Foi um dos meus pilares, das minhas risadas mais gostosas.
- À Mari Hammes, principalmente pelos acessos de riso! Depois de você Mari, minha crença nas “marianas” continua firme. Vocês são as melhores! Mari, Mari, Mari, Mari...Mari! Seu nome é o melhor para as músicas. Sem esquecer que a “Caras” proporcionou momentos de muita sabedoria para nós! Aquela foto deveria estar nos meus resultados!

“ Ainda ontem, chorei de saudade....”

- Emile, outra mulher maluca e indecisa, um turbilhão de emoções. Pra ela, o amanhã já é outro dia MESMO! Em 20 minutos, tudo pode mudar! Companheira para todas as horas.
- Juliana Vidal, chegando de mansinho e com firmeza, conquistando todo mundo.
- Joana, também amante das Giárdias, e mesmo com muito oxigênio seremos sempre as “anaeróbias”! Claudia Maia, outra “anaeróbia”, que compartilhou muito da sua experiência comigo.
- Agradeço, com muita educação, meu amigo Leandro Lemgruber, principalmente por ser tão educado todas as vezes que fomos comprar comida na hora do almoço;
- Bel, Dani Cavalcanti e Juliana Dutra...obrigada pelos conhecimentos que só muita experiência pode dar; Gustavo, obrigada pelos ensinamentos na bendita força atômica.
- As sempre graciosas Karlinha, Tati, Gisele e Mari Garcia. Vocês agora são as garotas do armário!
- Kildare, por todos os ensinamentos sobre microscópios;
- À Prof. Lina Zingali, do Instituto de Bioquímica, por todas as explicações e ensinamentos; e a todos da Unidade de Espectrometria de Massas (Patrícia, Ana e Silas) que sempre me auxiliaram e me deixaram à vontade.
- À Helena, Mauro e Professor Peralta, do Laboratório de Sorologia do Instituto de Microbiologia, que no último ano foram colaboradores com “C” maiúsculo. Ao Thiago Guimarães por toda sua alegria- sua risada nunca mais vai sair da memória. Valeu!
- Ao Bosco e à Nete: vocês são a força do laboratório; a dupla dinâmica perfeita. Não imagino o Hertha Meyer sem vocês. À Ana Cristina, ao Deda, Noêmia e à Cazuzza, por todo apoio, nunca negado.
- Aos “revólveres” da vida, que me ajudaram a liberar a tensão naqueles momentos que queria esconder corpos. A tensão sempre passava depois de vocês...

- E não podemos esquecer que juntos, somos fortes!

“Todos juntos somos fortes,
somos flecha e somos arco,
todos nós no mesmo barco,
não há nada pra temer.

Ao meu lado há um amigo que é preciso proteger!

Todos juntos somos fortes, não há nada pra temer!”

Os Saltimbancos

RESUMO

Giardia lamblia é um protozoário multiflagelar que coloniza o intestino delgado de vertebrados, causando a giardíase. Trofozoítos de *Giardia* aderem ao epitélio intestinal com o auxílio de estruturas do citoesquelto. *G. lamblia* possui várias estruturas microtubulares, tais como: o disco ventral, uma espiral de microtúbulos localizado na região anterior da célula contendo as microfitas; o corpo mediano, o qual ainda não possui uma função definida; o funis, envolvido na motilidade celular; e quatro pares de flagelos. Muitas drogas que atuam nas proteínas do citoesqueleto são utilizadas para estudar as funções relacionadas ao citoesqueleto. A orizalina, um herbicida que se liga preferencialmente a α -tubulina, foi usada como ferramenta para estudar a dinâmica do sistema microtubular de *Giardia lamblia*. Trofozoítos foram tratados com orizalina e seus efeitos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, e por microscopia de fluorescência, utilizando anticorpos anti α -tubulina. A análise da curva de crescimento mostrou que células tratadas com orizalina apresentaram uma redução da proliferação, após a adição da droga. Observamos que as células, após o tratamento, não eram capazes de completar a divisão celular. Agregados de células foram observados e os flagelos mostraram-se mais curtos. Contudo o disco ventral não sofreu modificações. Devido a importância dessa estrutura microtubular na adesão, e conseqüente permanência da infecção, decidimos caracterizar a composição protéica do disco ventral. Desenvolvemos um novo protocolo para isolamento do disco, demonstrando por microscopia eletrônica de transmissão a pureza da fração isolada. Por microscopia de força atômica analisamos a estrutura intacta do disco. Usando eletroforese uni e bi-dimensional e espectrometria de massa, analisamos a constituição protéica do material isolado. Identificamos proteínas com funções já conhecidas, como a família das tubulinas e giardinas; prováveis contaminantes, como as encontradas no soro bovino adulto e no meio de cultivo; e proteínas anotadas no genoma de *Giardia*, mas ainda não identificadas no disco ventral. Portanto, a caracterização, tanto morfológicas quanto bioquímicas, dos componentes do citoesqueleto de *Giardia lamblia*, contribuíram para o entendimento da dinâmica dessas estruturas durante a adesão do parasito.

ABSTRACT

Giardia lamblia is a multiflagelated protozoon that inhabits the small intestine of vertebrates, causing giardiasis. In order to colonize this region, the trophozoitic form remains attached to the epithelial cells by means of cytoskeletal elements. *G. lamblia* possesses several microtubular structures namely: the ventral disk, a microtubular spiral containing microtubules and cross-bridges; the median body, whose function is still uncertain; the funis – involved in cell motility and the four pairs of flagella. Several drugs that target cytoskeletal proteins have been used in the study of the cytoskeleton function and dynamics. Oryzalin, an herbicide that binds preferentially to α -tubulin, was used as a tool to the study of the function and dynamics of *Giardia lamblia* microtubular systems. The trophozoites were treated with oryzalin and its effects were analyzed by transmission and scanning electron microscopy and also by immunofluorescence microscopy using anti α -tubulin antibodies. Growth inhibition assays showed that oryzalin treated cells had a decrease after addition of drug. We observed that cells after treatment were not able to complete cell division. Several multiform aggregates of cells were seen and the flagella showed extensive shortening, but the ventral disk did not suffer modifications. Due to importance of this structure in host infection, we decided to point out the protein composition of ventral disk. We have developed a new protocol for disk isolation, checking with transmission electron microscopy the purity of fraction. With Atomic Force Microscopy, we analyzed the intact structure of disk. Using 1D and 2D-PAGE and mass spectrometry, we also analyzed the protein of isolated material. We identified proteins with known function, like the tubulin and giardin families; contaminants, like the proteins of adult bovine serum and culture medium; and proteins annotated in *Giardia* genome, but not yet identified in ventral disk. Thus, morphological and biochemical characterizations of ventral disk contribute to understanding the dynamic of this structures during *Giardia* adhesion.

Lista de Abreviaturas

- BSA- Albumina bovina
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DTT - ditioneitol
- GAGs – glicosaminoglicanas
- GLP - Glucagon-like peptide
- MALDI – “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization” (ionização a laser assistida por matriz)
- MTSB - Microtubule Stabilizing buffer
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- PBS – Solução salina tamponada por fosfato
- PHEM - PIPES -HEPES-EGTA-magnésio
- PKA – proteína quinase A
- SBA – Soro bovino adulto
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
- SDS– dodecil sulfato de sódio
- Q-TOF – Analisadores associados do tipo quadrupolo e tempo de voo
- TBS- Tris e NaCl
- TOF – Analisador do tipo tempo de voo
- VAD – disco adesivo ventral
- 2D-PAGE – Eletroforese Bidimensional

ÍNDICE

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de abreviaturas	xii
I – INTRODUÇÃO	1
1. <i>Giardia lamblia</i>	1
2. Giardíase e o Homem	5
3. Morfologia Geral	6
3.1 O Citoesqueleto em células eucarióticas	9
3.2 O Citoesqueleto de <i>Giardia lamblia</i>	11
3.2.1 Disco Ventral	13
3.2.2 A adesão ao hospedeiro e o disco ventral	17
3.2.3 Drogas e o estudo do citoesqueleto de <i>Giardia lamblia</i>	19
3.3 Orizalina	21
II – JUSTIFICATIVA	23
III – OBJETIVOS	<u>24</u>
IV – METODOLOGIA	25
1. Cultivo dos parasitas	25
2. Orizalina	25
3. Curva de crescimento	25
4. Imunofluorescência	26
5. Microscopia Eletrônica de Varredura	26
6. Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo	27
7. Isolamento do disco ventral de <i>Giardia lamblia</i>	28

8. Técnica da contrastação por molibdato de amônio	29
9. Microscopia Eletrônica de Transmissão	29
10. Microscopia de Força Atômica	29
11. Análise por transferência eletroforética.....	30
12. Obtenção do extrato protéico do disco ventral	31
13. Análise das proteínas do disco ventral	31
14. Digestão das proteínas	32
15. Coloração dos géis	33
16. Espectrometria de massas	33
V – RESULTADOS	34
1. Tratamento com orizalina	34
1.1 Efeito na proliferação de <i>Giardia lamblia</i>	34
1.2 Alterações na morfologia de <i>Giardia lamblia</i>	36
1.3 Síntese de tubulina	50
2. Disco ventral	52
2.1 Isolamento do disco ventral	52
2.2 Proteômica do Disco ventral	59
VI – DISCUSSÃO	66
1. Tratamento com Orizalina	66
1.1 Efeitos na proliferação de <i>Giardia lamblia</i>	66
1.2 Alterações na Ultraestrutura de <i>Giardia lamblia</i>	67
1.3 Síntese de tubulina	68
2. Isolamento do disco ventral	69
2.1 Perfil protéico do disco ventral	70
VII – CONCLUSÕES	73
VIII – REFERÊNCIAS	74

I - INTRODUÇÃO

1. *Giardia lamblia*

Giardia lamblia é o parasita intestinal causador da giardíase em seres humanos. Esse protozoário flagelado pertence à classe Zoomastigophorea, à ordem Diplomonadida e à família Hexamitidae. Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) observou pela primeira vez trofozoítos de *Giardia* de suas próprias fezes. Com o microscópio rudimentar que utilizava, não foi possível descrever com precisão o organismo, mas narrou a presença de “animáculos” que se moviam de forma característica. No século XIX, Vilem Lambl (1824-1895) descreve esse protozoário, e seu sobrenome foi dado ao parasito, em 1888, por Blanchard. Acredita-se que Lambl não observou a forma cística, que mais tarde foi reconhecida por Grassi como sendo de *Giardia*.

A nomenclatura foi proposta por vários pesquisadores. Filice, em 1952, em sua tese de doutorado, propôs, baseado em alguns critérios, uma nova divisão para a denominação de espécies de *Giardia*. Dentre esses critérios, podemos citar: a relação espécie-hospedeiro; formato do corpo mediano – uma estrutura do citoesqueleto, discutida posteriormente; desenvolvimento dos flagelos caudais; e tamanho e forma do parasito. Atualmente, as espécies aceitas de *Giardia* e suas principais características morfológicas são (Figura 1):

- *Giardia lamblia* (syn. *intestinalis*, *duodenalis*): presença de corpo mediano alongado disposto transversalmente no centro da célula; corpo piriforme delgado; flagelos caudais de tamanhos iguais. Espécie encontrada em mamíferos, incluindo o ser

humano, aves e répteis. Em todo o presente estudo denominaremos a espécie estudada como *Giardia lamblia*.

- *Giardia muris*: presença de dois corpos medianos pequenos; e corpo piriforme arredondado. Espécie encontrada em roedores, aves e répteis.
- *Giardia agilis*: presença de um corpo mediano em forma de gota; e corpo celular muito alongado. Espécie encontrada apenas em anfíbios.

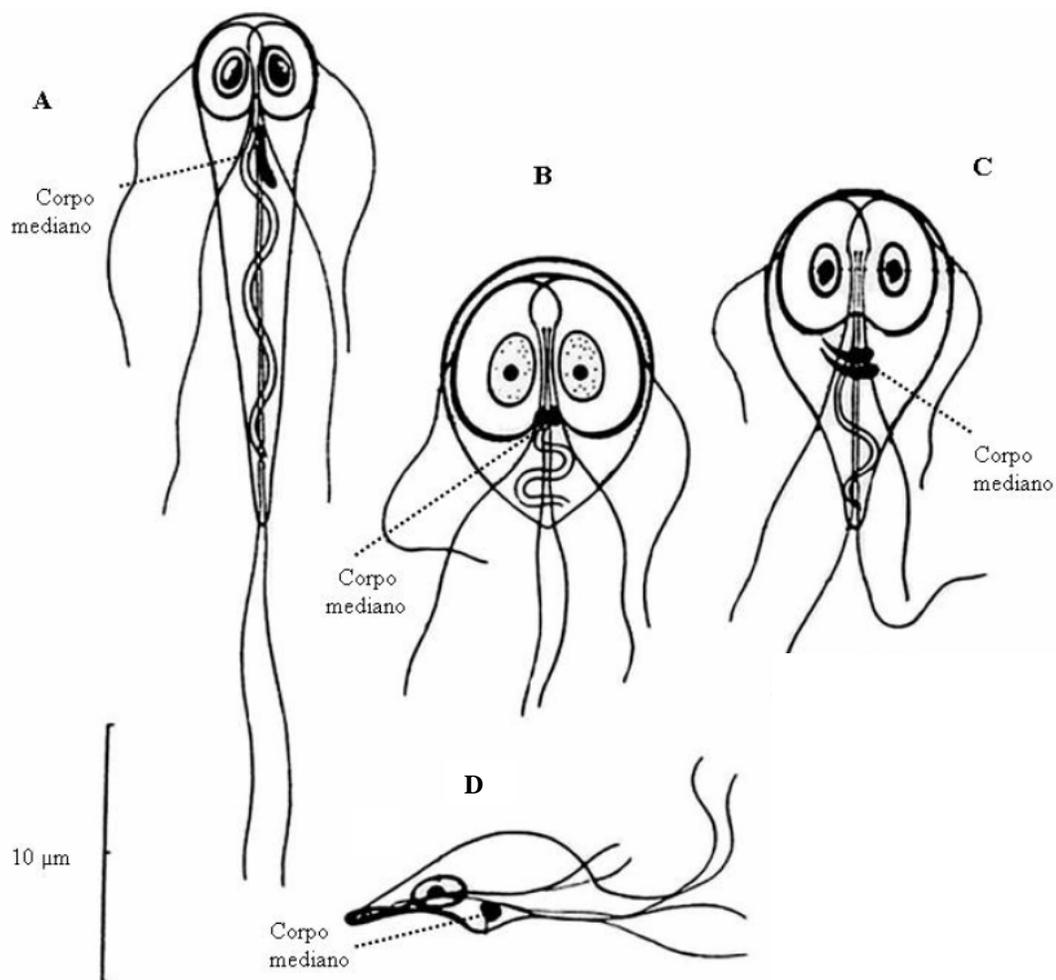


Figura 1: Esquema representando algumas espécies de *Giardia*. **A:** *Giardia agilis*. **B:** *Giardia muris*. **C:** *Giardia lamblia*. **D:** vista lateral de trofozoíto de *G. lamblia* aderido.

Esse protozoário apresenta dois estágios no seu ciclo de vida: uma forma denominada trofozoíto e a forma infectante denominada cisto. A infecção se inicia com a ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos, que têm grande resistência a variações do meio (Figura 2). Atualmente, a transferência fecal-oral de cistos de *Giardia* vem sendo considerada a maior via de transmissão (Roxstrom-Lindquist *et al.*, 2006). O cisto alcança o estômago e posteriormente chega ao intestino delgado, onde sofre o processo de desencistamento, liberando dois trofozoítos. Os trofozoítos, então, aderem ao epitélio intestinal, causando a doença que muitas vezes pode ser assintomática. Depois de aderido ao epitélio intestinal, o trofozoíto pode dividir-se por fissão binária, sendo a mitose semi-aberta (Sagolla *et al.*, 2006). O encistamento ocorre ainda no trato intestinal humano, onde os trofozoítos sofrem modificações estruturais e bioquímicas, com a redução drástica de nutrientes e o aumento do pH, e, em casos de diarréias intensas, os trofozoítos são liberados junto com os cistos no ambiente através das fezes (Adam, 2001). Contudo, os trofozoítos não sobrevivem no meio externo. Os cistos encontrados nas fezes podem contaminar água, alimentos e as mãos, fechando o ciclo.

O ciclo de vida de *Giardia lamblia*

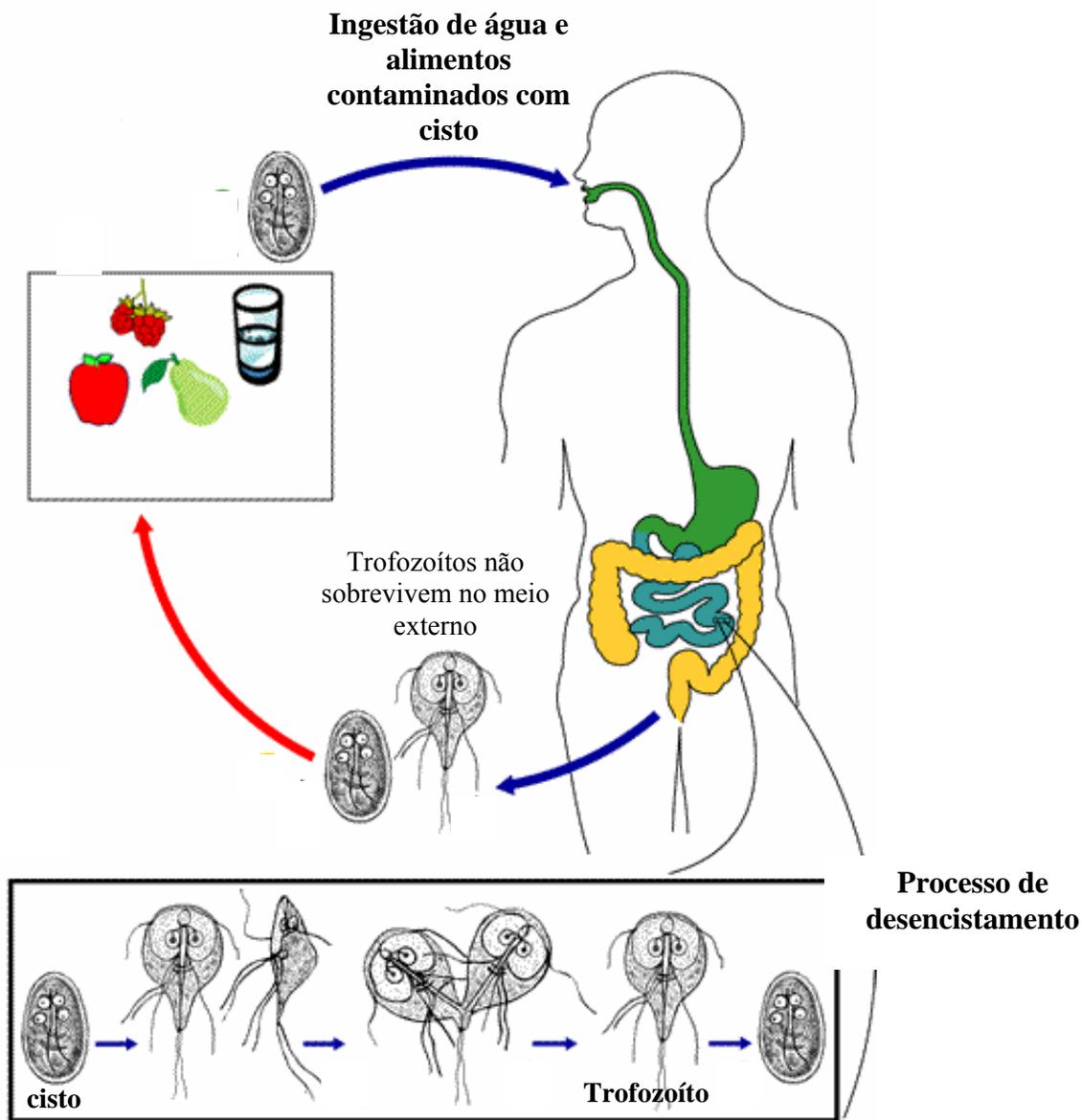


Figura 2: Ciclo de vida de *G.lamblia*. Adaptado de: CDC-USA Center for Disease Control. www.cdc.gov

2. Giardíase e o Homem

A giardíase, em muitos casos, é assintomática, mas pode ser associada a diarreias severas, má absorção de nutrientes pelo intestino delgado e perda de peso, quando a doença é crônica. Essa diferença, quanto à infecção em humanos, pode ser explicada de acordo com alguns fatores, tais como: sistema imune e idade do hospedeiro, padrão nutricional, dose da infecção, prováveis co-infecções e tipo de cepa do parasita (Farthing, 1997; Faubert, 2000). Acreditava-se que trofozoítos de *Giardia* pudessem formar uma barreira mecânica no intestino, barrando a absorção de nutrientes. Contudo, Roxstrom-Lindquist e colaboradores, em 2006, refutaram essa idéia, fazendo uma interessante comparação entre o número de parasitos, a dose da infecção (de 10 a 100 cistos em média), o tempo de geração (aproximadamente de 6 a 12h *in vitro*) e o tamanho médio da superfície do intestino delgado, concluindo que após 10 dias de infecção, a área colonizada seria muito pequena comparada com a área total do intestino delgado (Roxstrom-Lindquist *et al.*, 2006). Experimentos demonstraram que a infecção por *Giardia* causaria o rearranjo de F-actina e α -actinina em células duodenais, reduzindo a resistência elétrica transepitelial do intestino, assim como ocasionaria o rompimento de junções oclusivas entre as células intestinais (Teoh, 2000; Chin, 2002).

A infecção em humanos é caracterizada por uma pequena inflamação na mucosa intestinal, o que indica uma resposta local do sistema imune do hospedeiro. Algumas barreiras naturais dificultam o acesso de *Giardia* ao epitélio intestinal, tais como a camada de muco, o peristaltismo, proteases e lipases. Contudo, especula-se que as proteínas variantes de superfície (VSPs), encontradas em *G.lambli*a, conferem uma resistência a essas proteases (Nash, 2002).

Trofozoítos de *Giardia* não invadem as células epiteliais. Eles movem-se com o auxílio dos flagelos e aderem na mucosa intestinal, por meio do disco ventral. Contudo, durante o desencistamento no intestino delgado, o disco ventral ainda não está com sua estrutura formada.

Durante as primeiras divisões, após o desencistamento, os fragmentos de disco se reorganizam, formando dois novos discos, que precisam rapidamente recuperar sua estrutura original para auxiliar a adesão na célula hospedeira. Ainda assim, uma via alternativa para a adesão rápida de *Giardia* foi sugerida. Antes da reconstrução completa do disco o parasita fixa-se por meio da α -1 giardina, uma proteína que liga cálcio e que possui uma atividade semelhante às lectinas (Weiland *et al.*, 2003).

Desse modo, o disco ventral, uma estrutura do citoesqueleto de *Giardia*, teria um papel decisivo na adesão à célula hospedeira e, conseqüentemente, na manutenção da infecção.

3. Morfologia Geral

Trofozoítos de *G. lamblia* apresentam corpos piriformes, com simetria bilateral, medindo de 12 a 15 μ m de comprimento e de 5 a 9 μ m de largura. Apresenta quatro pares de flagelos, denominados anteriores ou antero-laterais, ventrais, posteriores ou póstero-laterais e caudais (Figura 3). Além disso, os trofozoítos possuem dois núcleos, sem nucléolos, com cinco cromossomos cada e quantidades iguais de DNA, que se replicam quase ao mesmo tempo (Kabnick e Peattie, 1990; Yu *et al.*, 2002; Benchimol, 2005). Além disso, os núcleos diplóides apresentam a atividade transcricional praticamente idêntica (Yu *et al.*, 2002).

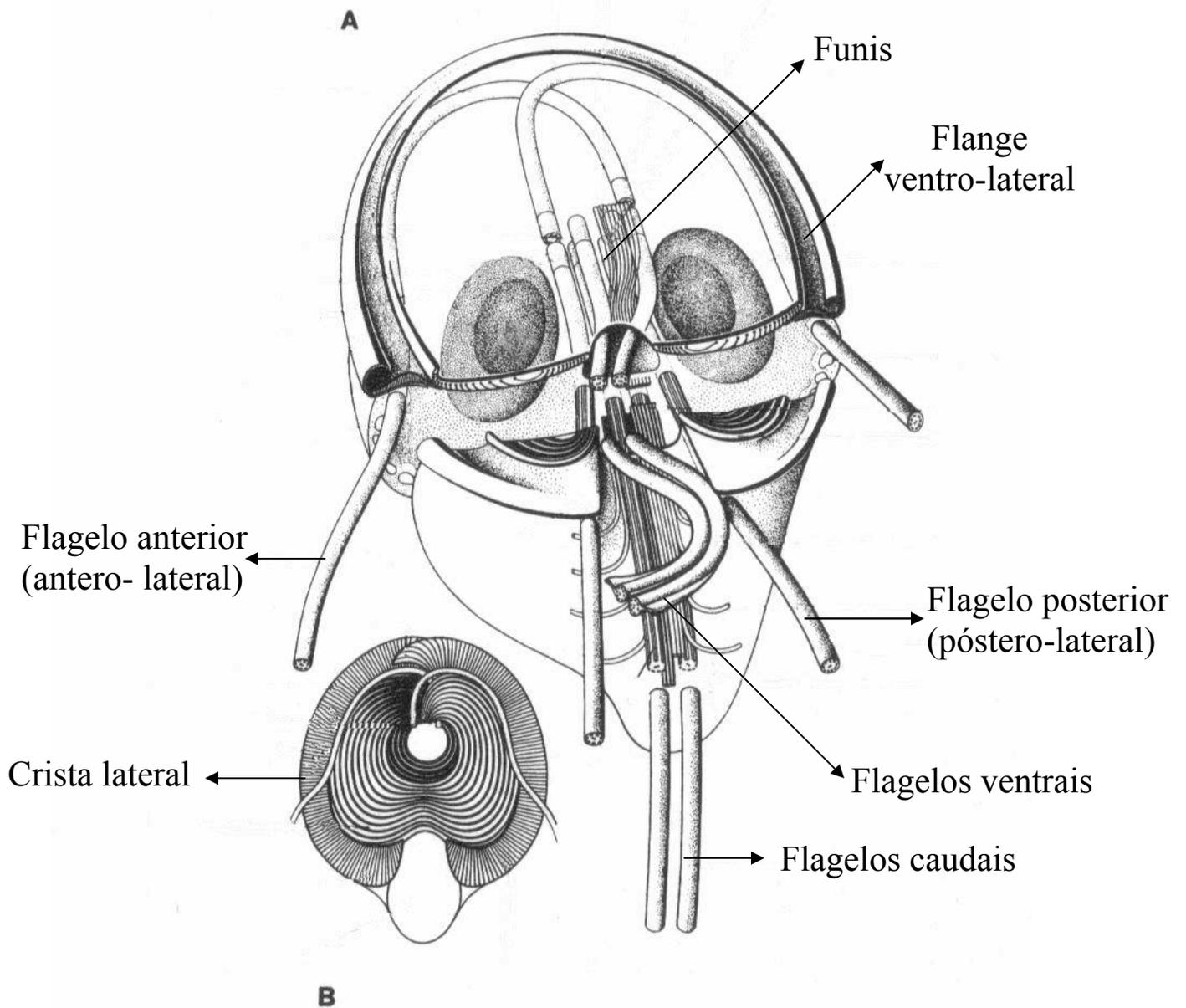


Figura 3: Representação da estrutura de *Giardia lamblia*. A – esquema do trofozoíto mostrando a disposição dos flagelos e da flange ventro-lateral de *Giardia*. B – detalhe do disco ventral, mostrando a crista lateral. Modificado de Meyer, 1992.

As mitocôndrias, organelas responsáveis pelo metabolismo energético em eucariotos superiores, não são encontradas em *Giardia lamblia*, que é considerada um anaeróbico tolerante a pequenas quantidades de oxigênio (microaerofílico). Contudo, foram identificados genes de proteínas consideradas marcadoras mitocondriais. Essas proteínas- IscU e IscS – foram encontradas em organelas denominadas mitossomos, consideradas mitocôndrias remanescentes (Tovar *et al.*, 2003). Neste trabalho, foram apresentadas marcações por todo citoplasma e ao redor dos corpos basais e dos axonemas flagelares. A função dos mitossomos em *G. lamblia* não seria prover energia para a célula, mas estaria relacionada com a maturação das proteínas ferro-enxofre (IscU e IscS), que são essenciais para a sobrevivência em ambientes sem oxigênio, como é o caso da *G. lamblia*.

Logo abaixo da membrana plasmática, ao longo da região dorsal, encontram-se as vesículas periféricas. São vesículas ovaladas, que contêm uma diversidade de proteínas como hidrolases, fosfatases ácidas e cisteíno-proteinases, indicando um possível papel lisossomal para as vesículas periféricas no processo endocítico de *G. lamblia* (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Em 1998, Lanfredi-Rangel e colaboradores marcaram as vesículas periféricas com Lucifer Yellow, um conhecido marcador de compartimentos endocíticos, indicando que as vesículas participam do sistema endocítico primitivo de *G. lamblia*. O mesmo trabalho demonstrou, através de tomografia eletrônica, a existência de uma ligação entre as vesículas periféricas e o retículo endoplasmático, sendo uma evidência de que o retículo endoplasmático participa da formação das vesículas periféricas (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998).

Giardia possui um retículo endoplasmático clássico, caracterizado por um conjunto de membranas arrançadas em cisternas e em pequeno número (Gillin *et al.*, 1996). Ainda não foi evidenciado, por técnicas de microscopia, um típico Complexo de Golgi, em trofozoítos. A formação de cisternas características de Golgi foi encontrada somente durante o processo de encistamento,

possivelmente para colaborar na formação das vesículas de encistamento, que carregam material para a construção da parede cística (Das e Gillin, 1996). Stefanic e colaboradores (2006) afirmam ainda que as vesículas de encistamento seriam compartimentos especializados do Golgi, apresentando características morfológicas semelhantes à essa organela. Contudo, a célula não deixa de realizar o transporte, endereçamento e secreção de suas proteínas, mesmo não possuindo um Golgi tipicamente estruturado (Stefanic *et al.*, 2006).

3.1 O Citoesqueleto em células eucarióticas

O citoesqueleto é uma rede complexa de proteínas filamentosas existentes nos mais variados tipos celulares. Em células eucarióticas o citoesqueleto é responsável pela forma, pelos movimentos celulares, transporte de organelas pelo citoplasma e pela segregação dos cromossomos durante a divisão celular.

As diferentes funções do citoesqueleto dependem principalmente do comportamento de três filamentos protéicos: microtúbulos, filamentos de actina ou microfilamentos e filamentos intermediários.

Os microtúbulos são túbulos longos e ocos constituídos por moléculas de α e β tubulina que formam protofilamentos lineares dispostos paralelamente em forma de cilindros. Essas estruturas de aproximadamente 25 nm de diâmetro crescem a partir de centros organizadores, os centrossomos, num processo denominado de nucleação (Alberts *et al.*, 2002). Os centrossomos possuem um tipo especial de tubulina, a γ -tubulina, que interage com as outras isoformas α e β , apoiando a nucleação dos microtúbulos (Stearns e Kirschner, 1994). O crescimento dos microtúbulos consiste na adição de subunidades α e β tubulina (polimerização) na sua extremidade. Essas extremidades são diferentes,

sendo a chamada extremidade “menos” de crescimento lento e a chamada de “mais” de crescimento rápido. Os processos de polimerização e despolimerização ocorrem de forma contínua nas células.

Os microtúbulos fazem parte de muitas estruturas encontradas em células animais e em protozoários, como os cílios e flagelos. Os cílios, responsáveis na maioria dos casos pela locomoção, contêm em seu interior um feixe de microtúbulos. Os flagelos são muito semelhantes aos cílios quanto à estrutura interna, mas são muito mais longos. O arranjo dos microtúbulos em cílios e flagelos é bem característico: nove pares de microtúbulos formando um anel ao redor de dois microtúbulos simples.

Os filamentos de actina possuem forma de hélice com aproximadamente 8 nm de espessura, sendo compostos de moléculas de actina globular. A actina é encontrada na célula na forma de filamentos ou monomérica. Esses estoques de actina monomérica são utilizados para formar filamentos quando e onde forem necessários. Os microfilamentos são estruturas polares, com as extremidades diferentes (“menos” de crescimento lento e “mais” de crescimento rápido). Comparados aos microtúbulos, na célula eucariótica, os microfilamentos são maiores, mais finos e mais flexíveis.

Os filamentos intermediários são fibras protéicas resistentes encontradas no citoplasma da maioria das células animais. Nessas células, os filamentos intermediários formam redes ao redor do núcleo e se estendem até a periferia celular, onde interagem com a membrana plasmática. Esses filamentos estão presentes no citoplasma de células sujeitas à grande tensão mecânica. As muitas proteínas que formam os filamentos intermediários não são globulares como as que formam microtúbulos e microfilamentos. São proteínas fibrosas e alongadas com um domínio em forma de bastão α -hélice.

3.2 O citoesqueleto de *Giardia lamblia*

Trofozoítos de *Giardia* apresentam uma grande estrutura do citoesqueleto em sua porção anterior, o disco ventral, e dois núcleos posicionados dorsalmente. O citoesqueleto de *Giardia* é composto por estruturas microtubulares estáveis como o disco ventral, o corpo mediano, o funis e os quatro pares de flagelos (Elmendorf *et al.*, 2003).

Os flagelos, divididos em anteriores, posteriores, ventrais e caudais, são estruturas auxiliadoras do movimento celular já descrito anteriormente (Holberton., 1974; Campanati *et al.*, 2002), e partem de corpos basais localizados entre os núcleos, arranjados em dois grupos de quatro. Cada um desses grupos está associado com um colar em banda disposto transversalmente, cuja função é desconhecida (Crossley *et al.*, 1986). A estrutura dos flagelos de *Giardia* é semelhante à dos eucariotos, apresentando nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central (9:2+2). Os flagelos ventrais, além da estrutura básica, possuem uma projeção de membrana preenchida por um material denso de composição desconhecida (Holberton, 1973). Kulda e Nohynkova (1995) comentam que essa projeção é equipada com uma estrutura em bastão denominada bastão paraflagelar ou paraxial, que estariam ligadas ao flagelo por finos filamentos. É importante lembrar que esses bastões paraflagelares encontrados nos flagelos ventrais são diferentes dos bastões associados aos axonemas dos flagelos anteriores e posteriores. Em recente trabalho, Davids e colaboradores (2008) identificaram, durante a mitose, proteína quinase A (PKA) nos flagelos anteriores, sugerindo um importante papel dessa estrutura na sinalização para o ciclo celular.

A caracterização química dos flagelos mostrou que, após tratamento com Triton X-100, as membranas, o bastão paraflagelar e o material que circunda os axonemas, desapareciam (Clark e Holberton, 1988). Os flagelos isolados continham proteínas axonemais e um conjunto adicional de polipeptídeos de 30 KDa. Após corrida dos extratos correspondentes, em géis de SDS-PAGE, foram

identificadas 5 bandas que não co-migravam com as giardinas (proteínas constituintes das microfitas do disco ventral), apresentando cargas diferentes das giardinas. Além disso, outro trabalho demonstrou que anticorpos anti-giardinas não se ligavam às bandas que correspondiam as proteínas flagelares em imunoblottings, confirmando que as proteínas flagelares são diferentes (Crossley *et al.*, 1986). Também, um anti-soro de coelho imunizado com as bandas flagelares de 30 KDa foi usado para localizar essas proteínas. Após testes de imunofluorescência, apenas os bastões paraflagelares, nos flagelos ventrais, mostraram marcação.

O funis é uma estrutura que faz parte do complexo microtubular em *Giardia*, sendo responsável pela ancoragem dos flagelos posteriores e pelos movimentos da região caudal do trofozoíto (Benchimol *et al.*, 2004). Na porção posterior da célula está o corpo mediano, um conjunto de microtúbulos dispostos longitudinalmente na região dorsal do parasita (Elmendorf *et al.*, 2003). A função dessa estrutura ainda é pouco esclarecida, mas alguns autores acreditam que o corpo mediano é o local de estoque de microtúbulos pré-polimerizados que serão usados no disco ventral (Feely *et al.*, 1990). Dados de Piva e Benchimol (2004) demonstraram que o corpo mediano varia em número, forma e posição, está presente na maioria das células e pode estar conectado com a membrana plasmática, com o disco ventral ou com o flagelo caudal (Piva e Benchimol, 2004).

Trabalho anterior realizado por nosso grupo, associando microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FESEM) e extração de membrana por detergente não-ionico para o estudo de *Herpetomonas megaseliae*, *Trypanosoma brucei* e *Giardia lamblia*, auxiliaram nos estudos estruturais do citoesqueleto desses parasitos (Sant'Anna *et al.*, 2005). Neste estudo, foi possível demonstrar que o arranjo em espiral dos microtúbulos do disco ventral de *G.lamblia* começa próximo aos corpos basais dos flagelos, além de observar com maior detalhe o colar em banda e a estrutura do funis.

O genoma de *G. lamblia* foi publicado recentemente (Morrison *et al.*, 2007). Os genes para o sistema microtubular de *Giardia* aparecem bem conservados, incluindo cinco formas de tubulina, além de centrinas, chaperonas específicas de tubulina e tirosinas ligases. Também, foram encontradas regiões no genoma para proteínas motoras, como as cinesinas e doze dineínas de cadeia pesada. O genoma de *Giardia* contém apenas um gene para actina, e este não possui seqüência igual a da actina clássica encontrada em microfilamentos de eucariotos. Foram identificados genes para outras proteínas como as α - giardinas (homólogas as anexinas), β - giardinas (homólogas as proteínas que agregam fibras estriadas), a família de proteínas GASP-180 e muitas proteínas coiled-coil associadas a microtúbulos (Morrison *et al.*, 2007).

3.2.1 Disco Ventral

O disco ventral já recebeu diversos nomes desde os primeiros estudos: película enrugada, disco estriado (Friend, 1966) e disco adesivo (Holberton 1973; Holberton e Ward, 1981). Contudo, muitos estudiosos da área contestam o nome de disco adesivo, alegando que essa estrutura não é a única efetora da adesão, preferindo chamá-la de disco ventral. Erlandsen e colaboradores, em estudo sobre a participação da flange-lateral na adesão celular, sugeriu a denominação de disco adesivo ventral (VAD) (Erlandsen *et al.*, 2004). O disco ventral não possui, até o momento, uma única função definida. Acredita-se que ele participe da adesão do parasita à célula hospedeira, e recentemente Benchimol (2004a) sugeriu a sua participação no processo de cariocinese.

O disco ventral é uma estrutura única localizada na porção anterior da célula sendo formada por um arranjo espiral de microtúbulos interligados por pequenos filamentos/fitas (Figura 3) (Holberton, 1973 e 1981). O disco possui forma de ferradura, tendo em sua extremidade externa uma estrutura fibrosa densa denominada crista lateral. Durante a adesão do parasita, os flagelos ventrais batem rápido e retiram líquido debaixo do disco ventral. A crista lateral sela esse conjunto no

substrato, criando uma zona de baixa pressão, o que ocasionaria a adesão do parasita ao epitélio intestinal (Holberton, 1973). O disco é uma estrutura rígida com um grande número de ligações cruzadas internas entre seus componentes. Ainda, em 2005, Benchimol demonstrou, por microscopia de varredura de alta resolução, que o disco estaria ligado por projeções, ainda não descritas, aos núcleos de *Giardia*.

Durante o processo de encistamento o disco ventral sofre algumas modificações (Palm *et al.*, 2005). No início do processo o disco ainda possui sua forma em espiral característica, contudo observou-se que mais de 90% das células perdiam a capacidade de adesão. Acompanhando o processo de encistamento, observou-se que o disco ventral sofre uma quebra, formando um conjunto com quatro fragmentos que ficam estocados dentro do cisto. Nesse mesmo trabalho obteve-se resultados expressivos quanto à caracterização protéica do citoesqueleto de *Giardia*. Através de frações do citoesqueleto e métodos bioquímicos foram identificadas proteínas da família da giardinas (Beta, Alpha, Delta e Gamma giardina) e Beta- tubulina, além de uma nova proteína, a SALP-1, homóloga as SFA (proteínas associadas a microtúbulos de sistema flagelar), identificada em pacientes com giardiase aguda (Palm *et al.*, 2005).

A estrutura do disco foi detalhada com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão (Holberton 1973, 1981). Em cortes ultrafinos o disco aparece como uma plataforma de microtúbulos espaçados (50 a 60 nm de distância) (Figura 4). Os microtúbulos da extremidade do disco estão “inseridos” na crista lateral, que é uma fibra elétron-densa que o circunda (Figura 3). A crista lateral forma as bordas do disco em *G. muris* e em *G. lamblia*, deixando uma impressão característica nas células intestinais após a adesão do parasito. De cada microtúbulo do disco partem projeções conhecidas como microfítas, sendo projetadas por todo comprimento do microtúbulo. Várias ligações cruzadas ligam fitas adjacentes numa fileira paralela, que leva à aparência estriada do disco em baixos aumentos.

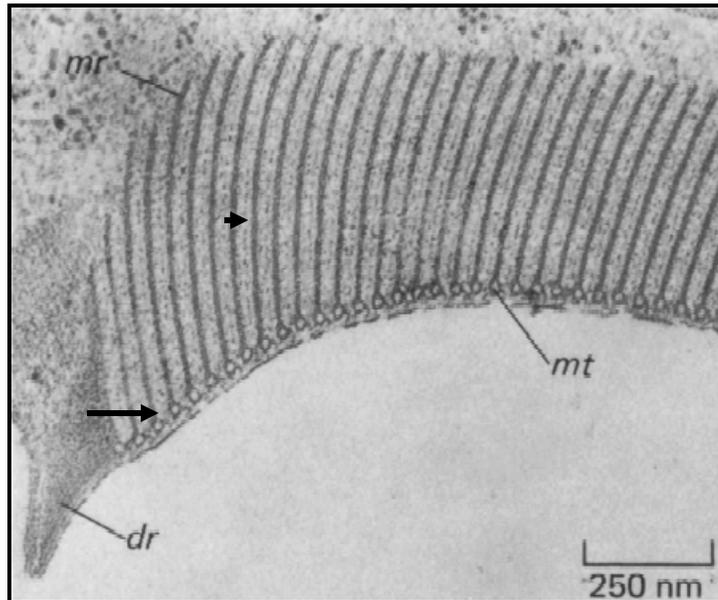


Figura 4: Micrografia eletrônica de transmissão de *G.lamblia* demonstrando a plataforma de microtúbulos (seta) de onde partem as microfítas (cabeça de seta) que formam o disco ventral. Retirado de Holberton e Ward, 1981.

Holberton e colaboradores, em trabalhos publicados na década de 1980, conseguiram isolar o citoesqueleto de *G. lamblia*, obtendo imagens detalhadas das microfítas por microscopia eletrônica de transmissão (Holberton 1981; Crossley e Holberton, 1983a, 1983b). Nos mesmos trabalhos verificou-se, por eletroforese em gel de poliacrilamida, a presença de proteínas de peso molecular de aproximadamente 30 kDa, que foram chamadas de giardinas. As giardinas foram consideradas proteínas majoritárias das microfítas. Trabalhos posteriores demonstraram, por gel bidimensional, que as giardinas são separadas em grupos (α , β e γ) e que as alfas giardinas possuíam similaridade com a família das anexinas (Peattie *et al.*, 1989). Em 1995, Morgan e Fernandez classificaram as alfas giardinas, através dos seus 22% de identidade, como representantes da sub-família das anexinas

XIX. Weiland e colaboradores, num estudo publicado em 2003, localizaram por imunocitoquímica em criocortes, a proteína alfa-1 giardina associada à parte citoplasmática da membrana plasmática. Nesse mesmo trabalho, demonstraram que a alfa-1 giardina era capaz de se ligar, de maneira dependente de Ca^{2+} , a glicosaminoglicanas (GAGs) do intestino delgado, sugerindo o papel das giardinas na interação parasito-hospedeiro (Weiland *et al.* 2003).

Outras proteínas, como a família das tubulinas, também foram descritas por Crossley e colaboradores (1986). As tubulinas foram identificadas através da análise de proteínas purificadas de homogenados de citoesqueleto. Foi demonstrado que as tubulinas são dominantes no citoesqueleto de *Giardia*, apresentando uma grande diversidade de localização, de isoformas e de modificações pós-traducionais (Campanati *et al.*, 2003). Além do disco ventral, outras estruturas são compostas por tubulina como os flagelos, corpos basais, corpo mediano e funis. Modificações pós-traducionais foram identificadas na tubulina do disco ventral. Soltys e Gupta (1994) e Campanati e colaboradores (2003) demonstraram que os axonemas, o disco e o corpo mediano possuíam α -tubulina acetilada. De acordo com Weber *et al* (1997), o disco também possui tubulina poliglicilada. Não foram detectadas, até o momento, α -tubulina tirosinada nem glutaminada em disco ventral (Boggild *et al*, 2002).

A actina e proteínas a ela associadas, como a α -actinina, miosina e vinculina, também foram descritas em trabalhos posteriores (Feely *et al.*, 1982; Narcisi *et al.*, 1994). A localização de actina na periferia do disco ventral, possivelmente na crista lateral, sugeriu um papel da crista na adesão do parasito, já que estas seriam estruturas contráteis. A presença de α -actinina e giardina no corpo mediano aponta o envolvimento dessa estrutura na formação do disco ventral durante o ciclo celular. Recentemente, contudo, na análise do genoma de *Giardia*, genes referentes a proteínas como a α -actinina, vinculina e miosina não foram encontrados (McArthur, 2000; Adam, 2000).

3.2.2 A adesão ao hospedeiro e o disco ventral

Giardia adere às células do epitélio intestinal para manter a infecção no hospedeiro e, também, para reduzir sua eliminação através dos movimentos peristálticos do intestino. O parasita adere normalmente em materiais biológicos e inertes como plásticos e vidros. Algumas condições são essenciais para o sucesso do cultivo, como a temperatura do meio, a presença de soro, o pH e as forças ou intensidades iônicas (Gillin e Reiner, 1982).

Muitos modelos procuram explicar a forma como ocorre a adesão de *Giardia*. Vejamos alguns deles:

Alguns grupos propõem que a adesão ocorra através da interação lectina-lectina, da superfície do parasita e da célula hospedeira (Farthing *et al.*, 1986). Esse processo seria facilitado pela presença de cargas negativas na superfície de *G. lamblia*, provavelmente pela presença de resíduos de açúcares. Contudo outros mecanismos podem estar envolvidos na adesão.

Os batimentos dos flagelos ventrais também podem estar envolvidos com a adesão. Os flagelos ventrais bateriam gerando um fluxo de líquido intenso, e conseqüentemente uma pressão negativa sob o disco ventral do parasita, e assim causando um processo similar a uma sucção (Holberton, 1974). Essa força de sucção manteria o parasita aderido à célula hospedeira. Entretanto, essa teoria não explica como o parasita se “desprende” da superfície, já que os flagelos ventrais batem continuamente e mesmo após a fixação (ou seja, com os flagelos ventrais imobilizados) o parasita continua aderido.

Outras hipóteses estão relacionadas à estrutura do disco ventral. Mueller e colaboradores, em 1974, acreditavam que a orientação dos microtúbulos no disco ventral poderia sofrer modificações, como estreitar, contrair e até mesmo se soltar. Esses movimentos poderiam alterar o diâmetro do disco, causando uma compressão e conseqüentemente a adesão. Estudos posteriores demonstraram ligações pelas microfitas entre os microtúbulos do disco, o que proporcionaria maior estabilidade à

estrutura. Assim, para sofrer modificações, essas fitas deveriam ser quebradas, dificultando a reorganização posterior do disco, tornando a proposta improvável.

A atividade contráctil da crista lateral (região densa na periferia do disco) foi sugerida após a detecção de actina nessa região da célula por Feely e colaboradores em 1982. Para essa teoria, o arranjo de microtúbulos do disco não precisaria alterar sua forma. Nesse caso, a crista lateral é que se deforma, causando uma elevação do disco, formando uma região côncava. Essa elevação causaria a compressão, alcançando, assim, a adesão. O contato da crista lateral com as células epiteliais é demonstrado pelos sinais encontrados após a saída do parasito da célula hospedeira. Essas lesões que a *Giardia* provoca nas células epiteliais já foram demonstradas em alguns trabalhos (Erlandsen e Chase, 1974; Sousa *et al.*, 2001). Em 2002, Campanati e colaboradores, em estudo sobre a dinâmica celular de *Giardia*, demonstraram por vídeo microscopia a contração do disco todo, não somente da crista lateral, e da região caudal, principalmente, durante o descolamento do substrato. Os autores sugerem que o movimento da região caudal é gerado por um complexo sistema microtubular, formado pelos axonemas dos flagelos ventrais e por um “folheto” de microtúbulos que seguem esses axonemas, que estaria sendo puxado por moléculas de dineínas (Campanati *et al.*, 2002). Contudo, não se sabe qual proteína contráctil faz o disco ventral contrair. Apesar de trabalhos recentes demonstrarem efeitos no disco após o tratamento com drogas anti actina (Corrêa e Benchimol, 2005), não foram identificados genes com seqüência clássica de actina e miosina em *G. lamblia* (Morrison *et al.*, 2007).

Atualmente, acredita-se que a adesão ocorra pela união de vários desses fatores. A adesão ocasionada pela formação de uma pressão negativa abaixo do disco ventral ainda é a teoria mais aceita. Contudo, trabalho recente (Erlandsen *et al.*, 2004) demonstrou que uma outra estrutura em *Giardia*, a flange ventro-lateral, teria um papel na adesão do trofozoíto. A flange ventro-lateral é uma estrutura “membranosa” que percorre toda a periferia da célula (Figura 3).

Erlandsen e colaboradores, em 2004, criaram um mecanismo para testar o papel na adesão da flange ventro-lateral, independente da teoria que defende a adesão pela formação de uma pressão negativa sob o disco. O grupo criou substratos de poliestireno irregular (uma superfície com vários pinos, de aproximadamente 2 µm de diâmetro e 1 µm de altura, distanciados por no máximo 5 µm) para evitar a formação da pressão negativa pelas células. Os parasitas aderidos nesse microsubstrato, visualizados por microscopia eletrônica de alta resolução, apresentaram uma projeção e adesão de pontos da flange ventro-lateral sobre o topo dos pinos. A presença de proteínas contrácteis, como a actina, pode estar ocasionando a formação dessas projeções da flange. Contudo, os autores sugerem que a adesão focal da flange ao substrato não está relacionada a proteínas contrácteis, mas sim com a presença de cargas na superfície do parasito ou interações de macromoléculas. Por fim, com esse estudo foi possível observar a participação da flange lateral na adesão de *Giardia* ao substrato, além de confirmar a participação do disco ventral nesse processo (Erlandsen *et al.*, 2004).

3.2.3 Drogas e o estudo do citoesqueleto de *Giardia lamblia*

Até o momento, o principal medicamento utilizado para tratamentos contra a giardíase é o metronidazol (Flagyl[®]), um composto pertencente ao grupo dos nitroimidazóis. Os benzimidazóis, como os albensazóis (Albenza[®]) e os mebendazóis (Vermox[®]) também demonstraram eficácia contra a giardíase. Os benzimidazóis agem ligando-se a β-tubulina dos microtúbulos de *Giardia* causando sua despolimerização e impedindo a captação de glicose pelo parasito (Venkatesan, 1998). O aumento do número de cepas resistentes após o uso desses medicamentos, além dos efeitos colaterais como náuseas, dores de cabeça e vômitos, torna necessário o estudo e desenvolvimento de novos fármacos contra a doença (Bendesky *et al.*, 2002).

Muitas drogas vêm sendo utilizadas para o estudo do citoesqueleto de *Giardia*, principalmente as que envolvem a inibição da polimerização da tubulina, a desorganização dos

microtúbulos e a inibição da polimerização de actina (Mariante *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2005). As drogas mais comuns utilizadas são as derivadas de benzimidazóis (como os albendazóis e mebendazóis), conhecidas por inibir a polimerização de microtúbulos, a citocalasina (inibição da polimerização de microfilamentos) e a jasplakinolida (estabilizadora de microfilamentos).

Trabalhos da década de 90 utilizando benzimidazóis, tanto os albendazóis (Albenza[®]) como os mebendazóis (Vermox[®]), em trofozoítos de *Giardia* demonstraram, através de microscopia eletrônica, modificações grosseiras na forma celular e na estrutura do disco ventral. O disco apresentava-se fragmentado, com seus microtúbulos e microfibras dispersos no citoplasma; já o sistema flagelar não apresentava modificações. Um precipitado elétron-denso foi identificado próximo aos microtúbulos do disco, mas até o momento não era conhecida sua composição (Edlind *et al.*, 1990; Chavez *et al.*, 1992). Chavez e colaboradores sugeriram que os benzimidazóis estariam agindo nos componentes das microfibras do disco ventral, possivelmente nas giardinas, proteínas específicas de *Giardia*.

Recentemente, trabalhos utilizando drogas inibidoras da polimerização de microtúbulos, como o nocodazol e a colchicina foram realizados, demonstrando efeitos significativos na ultraestrutura do citoesqueleto de *Giardia* (Mariante *et al.*, 2005). Neste trabalho, após o tratamento com nocodazol, além de uma diminuição no número de células aderidas ao substrato, demonstrou-se alterações nos trofozoítos, tais como a fragmentação do disco ventral, a presença de grandes vacúolos e o deslocamento dos axonemas flagelares. Também foi mostrado um precipitado elétron-denso na estrutura fragmentada do disco, sugerindo uma desorganização da tubulina, tanto do disco quanto do corpo mediano, e sua conseqüente deposição nos discos fragmentados. Essas deposições foram encontradas, como já explicitado, nos trabalhos de Edlind (1990) e Chavez (1992), mas a confirmação de que eram tubulina só foi evidenciado, recentemente, após ensaios imunocitoquímicos (Mariante *et al.*, 2005). Com o uso de colchicina, a permanência do parasito no

substrato foi maior, apenas diminuindo quando a concentração de droga utilizada ultrapassou 50 μM . Com concentrações ainda maiores (aproximadamente 200 μM), deformações no disco ventral foram visualizadas, assim como a inibição da citocinese, um número anormal de flagelos e *blebs* de membrana.

Trabalho recente demonstrou que, após o tratamento com citocalasina D e B, trofozoítos de *Giardia* tiveram uma inibição da replicação, sendo evidenciados grumos celulares (Corrêa *et al.*, 2005). Assim como no tratamento com nocodazóis e com a colchicina, após o tratamento com citocalasina, o disco ventral aparece fragmentado e próximo ao núcleo, e o número e a localização dos flagelos também são alterados. Duas hipóteses são sugeridas para a fragmentação do disco: a primeira é que a droga pode estar afetando possíveis moléculas de actina presentes no disco ventral; a outra é que a droga pode agir numa cascata de reações metabólicas, que poderiam afetar a organização estrutural do disco.

Como vimos, as drogas utilizadas até o momento contra o citoesqueleto de *Giardia*, mostraram efeitos significativos na estrutura do disco ventral, sendo este o principal alvo.

2.2 Orizalina

Os efeitos *in vitro* de orizalina, um composto herbicida dinitroanilino, tem sido verificado em células vegetais, causando a quebra dos microtúbulos estáveis e a inibição da divisão celular (Parka e Soper, 1977; Corbett *et al.*, 1984). Os efeitos da orizalina já foram observados também em protozoários incluindo *Tetrahymena* (Stargell *et al.*, 1992), *Trypanosoma spp.* (Chan *et al.*, 1993; Traub-Cseko *et al.*, 2001), *Leishmania spp.* (Chan *et al.*, 1991), *Entamoeba spp.* (Makioka *et al.*, 2000) *Cryptosporidium parvum* (Benbow *et al.*, 1998), *Plasmodium falciparum* (Fennell *et al.*, 2006) e *Toxoplasma gondii* (Stokkermans *et al.*, 1996; Morrissete *et al.*, 2002a). Até o momento, sabe-se

que a atividade dos dinitroanilinos é restrita a plantas e protozoários. Estes compostos são ineficazes contra microtúbulos de vertebrados e fungos (Hugdahl e Morejohn, 1993).

Trabalhos recentes demonstraram a forma de ação da orizalina (Morrissette *et al.*, 2002a; Mitra e Sept, 2006). Em 2002, Morrissette e colaboradores criaram um mutante de α -tubulina de *Toxoplasma gondii*. Essas mutações resultaram em resistência do parasito a orizalina, mostrando que essa droga liga-se a regiões da α -tubulina conhecidas por mediar as interações laterais entre os protofilamentos de tubulina.

O sítio de ação da orizalina na tubulina de protozoários parasitas foi determinado e localizado entre as “alças” ou *loopings* da α -tubulina (Mitra e Sept, 2006). Neste trabalho foi sugerido que a ligação da orizalina com a tubulina causaria quebras nos *loopings* e a conseqüente instabilidade dos microtúbulos.

Toda a diversidade de proteínas, mais especificamente de tubulina, apresentada anteriormente (Campanati *et al.*, 2003; Elmendorf *et al.*, 2003), sugere que *Giardia lamblia* possa ser um interessante modelo de estudo da heterogeneidade microtubular. A ação da orizalina nos componentes do citoesqueleto de *Giardia* é um importante meio para entender essas diferenças de estabilidade dos microtúbulos. A orizalina e outras drogas dinitroanilinas atuam somente em microtúbulos estáveis, sendo seu uso muito interessante para alguns parasitos, como *Trypanosoma cruzi*, que possui o citoesqueleto formado por microtúbulos estáveis. Também, como *Giardia* sp é considerada um dos organismos que divergiu mais cedo na escala evolutiva, embora essa hipótese esteja sendo extensivamente discutida (Cavalier-Smith, 2002), o estudo de seus sistemas microtubulares pode revelar o quão cedo, na evolução, essas estruturas se desenvolveram, como os microtúbulos se formaram e quando as modificações pós - traducionais foram introduzidas.

II –JUSTIFICATIVA

Até o momento os estudos com citoesqueleto de *Giardia lamblia* priorizaram uma abordagem estrutural, sendo descrito minuciosamente a organização das várias estruturas microtubulares. Contudo, a função de algumas estruturas, como o disco ventral, a flange lateral, o funis e o corpo mediano ainda não foram esclarecidos, assim como a real composição protéica dessas estruturas. Alguns trabalhos demonstraram a presença de modificações pós – traducionais, como a acetilação e a poliglicilação, nos microtúbulos de *Giardia* (Soltys e Gupta, 1994; Weber *et al.*, 1997; Boggild *et al.*, 2002; Campanati *et al.*, 2003). A descoberta de outras modificações significativas, no entanto, ainda devem ser encontradas. O uso de drogas anti - tubulina como a orizalina, o taxol e o nocodazol devem ser usadas para entender essas modificações, como também para entender a formação de estruturas do citoesqueleto.

Diferentes técnicas de microscopia, como a óptica, vídeo microscopia, a eletrônica (transmissão e varredura), auxiliaram muito na caracterização das estruturas do citoesqueleto de *Giardia*. Essa caracterização pode nos levar a um melhor entendimento de como essas estruturas estão envolvidas na patogenia do parasito. O entendimento da função e composição do citoesqueleto é de grande utilidade, sendo que possíveis alvos para quimioterápicos contra a giardíase poderiam ser encontrados nessas estruturas.

O disco ventral, mais especificamente, é considerado um “fator de virulência” direto de *Giardia*, já que é diretamente responsável pelo processo de adesão e deslocamento da célula. Ainda não sabemos qual é a sua constituição protéica específica. Portanto, as caracterizações, tanto morfológicas quanto bioquímicas, são vitais para os estudos futuros desse patógeno.

III-OBJETIVOS

Objetivo Geral

Entender melhor a estrutura e composição do citoesqueleto de *Giardia lamblia*.

Objetivos Específicos

- 1- Analisar os efeitos de orizalina, uma droga que tem como alvo microtúbulos estáveis, sobre a proliferação de *Giardia lamblia*;
- 2- Analisar as modificações no citoesqueleto de trofozoítos de *Giardia lamblia*, após o uso de orizalina, utilizando para isso técnicas de microscopia, como óptica e eletrônica de transmissão e varredura;
- 3- Padronizar um protocolo do isolamento do disco ventral;
- 4- Analisar a ultraestrutura do disco ventral
- 5- Identificar proteínas exclusivas do disco ventral, através de análise proteômica da estrutura isolada e intacta do disco.

IV - METODOLOGIA

1. CULTIVO DOS PARASITAS

Trofozoítos de *G.lamblia* foram cultivados em meio de cultura TYI-S-33 (Keister, 1983), suplementado com 10% de soro bovino, a pH 7,2 e a 37°C. As células são cultivadas em tubos de vidro e as passagens ou repiques foram a cada dois dias.

2. INCUBAÇÃO COM ORIZALINA

As células foram cultivadas na presença, ou não, de 1, 5,10, 50 e 100µM de orizalina (Sigma Aldrich- lot 322-108B), por 1, 24 e 48 horas. A droga foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 100 mM. Os controles apresentaram, portanto, incubação de 0,1% de DMSO. O cálculo do IC₅₀ (concentração da droga que inibe 50% do crescimento da cultura), foi realizado a partir da curva de inibição do crescimento.

3. CURVA DE CRESCIMENTO

Os tubos de cultura foram centrifugados a 8000g por 10 minutos, e o *pellet* ressuspensado em 5 ml de meio de cultura, resultando em 5×10^6 células/ml. As concentrações de orizalina utilizadas foram 1, 5,10, 50 e 100 µM, por 24 e 48 h de incubação. A droga foi adicionada após 24 horas de cultivo, no início da fase exponencial de crescimento, e este foi acompanhado por 48 horas. As contagens foram feitas em triplicata.

4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após tratamento com orizalina, os tubos contendo trofozoítos foram colocados no gelo, por dez minutos, e centrifugados a 120 g, por 15 minutos. As células foram, então, lavadas com PBS e aderidas em lamínulas cobertas com poli-L-Lisina. Em seguida, foram fixadas com 4% de formaldeído em tampão PHEM 0,1 M, pH 7,2 por uma hora. Para permeabilizar as células, usamos o tampão estabilizador de microtúbulos MTSB [4 M glycerol, 100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 5 mM CaCl₂], pH 6.8 (Gordon *et al.* 2001)] contendo 0,5% de detergente não-iônico Triton X-100. Após 15 minutos, as ligações não específicas foram bloqueadas com solução de PBS contendo 3% de albumina e 0,1% de gelatina de peixe (pH 8.0), por 30 minutos. A incubação com anticorpo primário anti α -tubulina TAT-1 (gentilmente cedido pelo Dr. Keith Gull, Oxford University, England) foi realizada por uma hora. Depois, as células foram lavadas cinco vezes com tampão de bloqueio, e incubadas com anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG complexado a Alexa 488, Molecular Probes), por uma hora. Os parasitos foram lavados duas vezes em PBS. As lâminas foram montadas sobre N-propil-galato e finalmente observadas em microscópio óptico de fluorescência Zeiss Axioplan, equipado com câmera 3CCD (C5810 – Hamamatsu).

5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Células tratadas com orizalina foram aderidas em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina por 2 minutos, e posteriormente, fixadas com 2,5% de glutaraldeído, 4% de sacarose em tampão PHEM 0,1 M, por uma hora. As células foram pós-fixadas em 1% de OsO₄, desidratadas em etanol, submetidas à secagem pelo ponto crítico (aparelho Balzer's) usando CO₂, e metalizadas com ouro. As amostras foram examinadas no microscópio de varredura Jeol 5800, operando com voltagem de 15 KV.

6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE EMISSÃO DE CAMPO

O protocolo para visualização do citoesqueleto, após extração de membrana, por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução foi previamente desenvolvido (Sant'Anna *et al.*, 2005).

Posteriormente, após o tratamento com orizalina, as células foram colocadas para aderir por 2 minutos em lamínulas de vidro cobertas com 0,1 % de poli-l-lisina. Após a adesão, a membrana do parasita foi extraída com 1 % de detergente NP-40 em tampão PHEM 0,1M, por 10 minutos. A amostra foi fixada em 2,5 % de glutaraldeído em tampão PHEM, por 30 minutos, desidratada em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem pelo ponto crítico usando CO₂. As amostras, depois de montadas em substrato próprio, foram metalizadas com uma fina camada de ouro.

Discos ventrais isolados (procedimento descrito a seguir) foram colocados para aderirem em lamínulas de vidro cobertas com 0,1% de poli-l-lisina e depois desidratados em série crescente de acetona e seco pelo método do ponto crítico (aparelho Balzer's) usando CO₂. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro. A observação dos materiais foi feita no microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo (FESEM), JEOL JSM-6340-F FESEM.

7. ISOLAMENTO DO DISCO VENTRAL DE *GIARDIA LAMBLIA*

Trofozoítos (10^7 de células) foram cultivados em tubos de vidro por 48 horas. Após serem colocados no gelo por 15 minutos, a solução foi centrifugada (Sorvall RC-5B) à 12000 g por 20 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão PHEM 0,1 M [60mM Pipes, 20mM HEPES, 10mM EGTA and 2mM $MgCl_2$ (Schliwa e Blerkom 1981)], pH 7,2, com adição de 1% de Triton X-100, à 37°C por 10 minutos (Figura 5). Separou-se o *pellet* que foi posteriormente sonicado por período de 10 a 15 segundos com amplitude de 8%. A amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10000g e o *pellet* obtido foi lavado cinco vezes em PBS [0,02M Na_2HPO_4 , 0,02M NaH_2PO_4 , 0,9% NaCl].

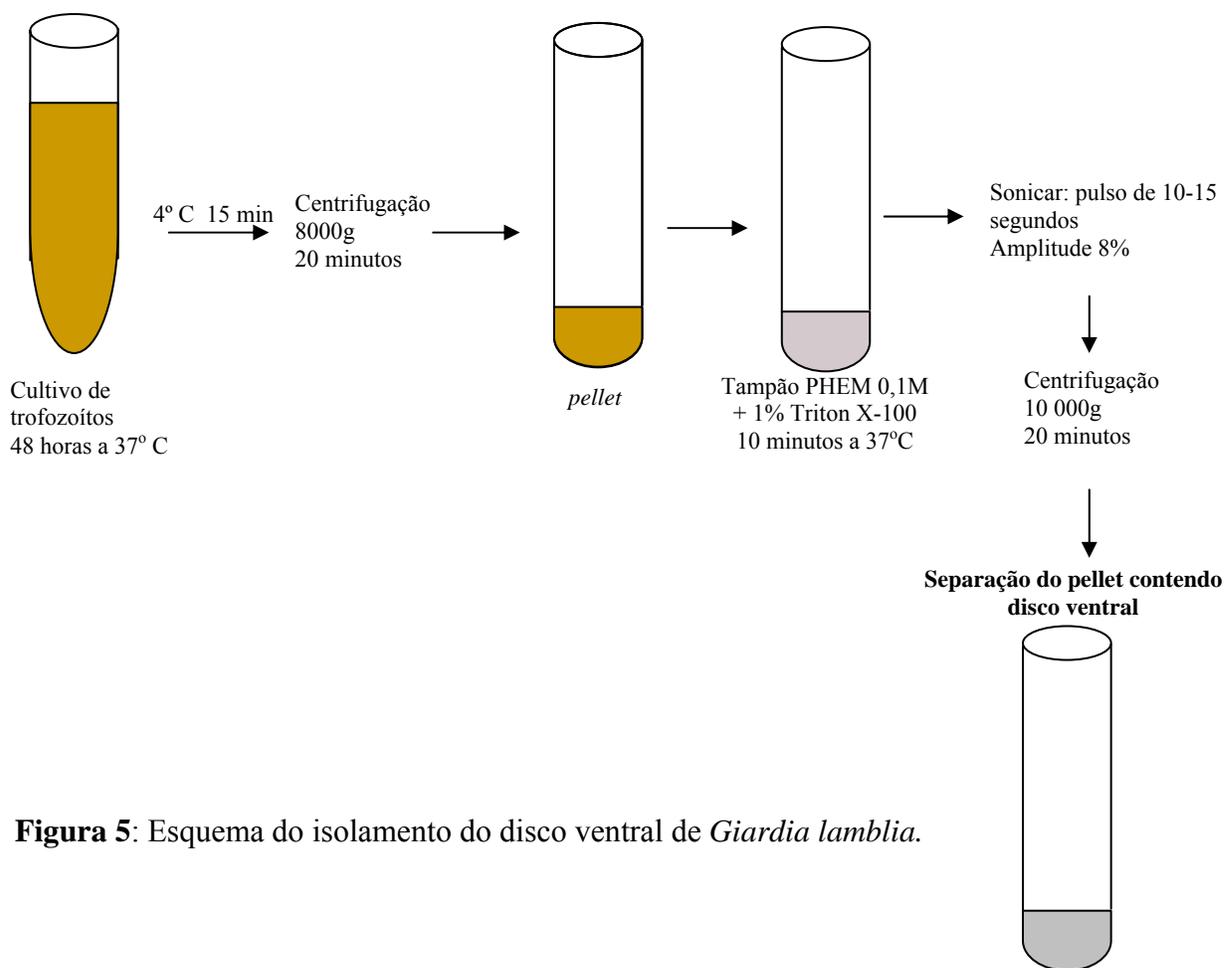


Figura 5: Esquema do isolamento do disco ventral de *Giardia lamblia*.

8. CONTRASTAÇÃO POR MOLIBDATO DE AMÔNIO

A amostra de discos isolados foi colocada sobre grades de níquel, previamente cobertas com 5% de FORMVAR em clorofórmio, por dois minutos. O material foi então lavado em tampão PHEM 0,1M, pH 7,2 duas vezes e, posteriormente, contrastado com 1% de molibdato de amônio por 3 minutos e observado por microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM900)

9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído, 4% de sacarose em tampão PHEM 0,1 M, por 1 hora. Foram lavadas três vezes, neste mesmo tampão, e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio, por 40 minutos. A amostra foi novamente lavada em PBS [0,02M Na₂HPO₄, 0,02M NaH₂PO₄, 0,9% NaCl] e desidratada em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes de 100%), 15 minutos em cada etapa. O material foi então infiltrado em resina (Epon) com acetona em várias proporções: 2:1(acetona/Epon), por aproximadamente 12 horas; 1:1, por 6 horas; e 1:2 em resina pura, por 6 horas, no mínimo. O material foi colocado em fôrma, por 72 horas, em estufa a 60°C, para que a resina polimerizasse. Após a polimerização, foram feitos cortes ultrafinos em ultramicrótomo. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila 5% em água destilada, por 40 minutos, e citrato de chumbo, por 5 minutos. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM900).

10. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Trofozoítos de *Giardia* foram colocados para aderir em lâmina. O material foi lavado duas vezes em tampão PHEM. Após a adesão, a membrana do parasita foi extraída com 1 % de detergente

NP-40 em tampão PHEM 0,1M, por 10 minutos. A amostra foi lavada duas vezes em água e seca com gás argônio direto na lâmina. Discos ventrais isolados também foram processados para Microscopia de Força Atômica. Após a adesão em lamínulas, a amostra foi lavada duas vezes e seca pelo método do ponto crítico (aparelho Balzer's) usando CO₂. A obtenção das imagens foi feita utilizando um microscópio de força atômica modelo MFP-3D SA Atomic Force Microscope (Asylum Research, Santa Barbara, CA) operando em modo contato intermitente (tapping mode) à temperatura ambiente. Lâminas contendo o material foram dispostas sobre uma plataforma (scanner XY) e uma câmera CCD foi utilizada para localizar os parasitos. Os cantilêveres utilizados foram os tetraédricos, modelo AC240TS (Olympus, Tokyo, Japan), com constante de mola nominal de 2 N/m. O processamento de imagem foi realizada utilizando como plataforma o programa IGOR-PRO (Wavemetrics, Portland, OR, USA).

11. ANÁLISE POR TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA

O lisado total de trofozoítos não tratados e após o tratamento com 50 e 100 µM de orizalina, foram ressuspensos em tampão 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (v/v), 10% 2-B-mercaptoetanol (v/v), 0,012% glicerol, azul de bromofenol e fervidos por 5 minutos e aplicados sobre um gel de SDS-PAGE. Foram adicionados 30µg de proteína, tanto da amostra com trofozoítos não tratados como da amostra após tratamento com orizalina, em um mini gel de poliacrilamida 7,5 %, a 120 V, a temperatura ambiente. Depois de separadas por eletroforese, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose em uma cuba (BioRad), 100V por 100 minutos em tampão Tris-Glicina e 20% metanol. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado (Molico 9%) em TBS-Tween 20 0,05% e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo α-tubulina TAT-1 (gentilmente cedido pelo Dr. Keith Gull, Oxford University, England), na diluição de 1:10. As membranas foram lavadas em tampão de bloqueio e incubadas com o

anticorpo secundário anti- IGg de camundongo conjugada a fosfatase. A marcação foi revelada usando o kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi parada com H₂O destilada. O controle de carregamento foi realizado após coloração da membrana com Pounce.

12. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO DO DISCO VENTRAL DE *G. LAMBLIA*

Amostras com trofozoítos e disco ventral de *G. lamblia* foram lavadas duas vezes em PBS pH 7.2, e ressuspensas no mesmo tampão. O extrato protéico bruto das duas amostras foi obtido com ciclos de congelamento e descongelamento, e foi adicionado inibidor de protease. A dosagem protéica foi realizada segundo Lowry e colaboradores, 1951.

13. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DO DISCO VENTRAL

O lisado total de trofozoítos e do disco ventral foram ressuspensos em tampão 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (v/v), 10% 2-B-mercaptoetanol (v/v), 0,012% glicerol, azul de bromofenol e fervidos por 5 minutos e aplicados sobre um gel de SDS-PAGE. Foram adicionados 30 µg de proteína, tanto da amostra com lisado total quanto as do disco isolado, em um gel de poliacrilamida 7,5 % para o gel uni-dimensional, para avaliar as condições da amostras antes de submetê-las à corrida eletroforética bidimensional. A corrida foi realizada em câmara mini-gel Bio-Rad a 100 Volts, a temperatura ambiente.

Para remover sais e detergentes da amostra, que poderiam interferir na corrida eletroforética, foi realizada uma precipitação de proteínas com o 2-D Clean-Up Kit (GE, EUA). Foram adicionados 100 µg de proteína à corrida eletroforética bi-dimensional em gel desnaturante na concentração de 12 %. A primeira etapa corresponde à focalização isoeétrica, também conhecida como primeira dimensão, na qual as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos. As amostras

em tampão de re-hidratação foram aplicadas em uma tira de gel de poliacrilamida com um gradiente imobilizado de pH em intervalos de 3 a 10. As tiras foram cobertas com DryStrip cover fluid (GE, EUA) para evitar cristalização da uréia e ressecamento do gel, sendo submetidas em seguida à focalização no sistema Ettan IPGphor (GE, EUA). Já a segunda etapa corresponde à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. As tiras da primeira dimensão foram colocadas em contato com um gel desnaturante de poliacrilamida e cobertas por uma solução de agarose (agarose 0,5%, azul de bromofenol 0,002% em tampão Tris-glicina). A corrida eletroforética foi feita a 100 volts em câmara mini-gel Bio- Rad.

14. DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS

As bandas identificadas nos géis uni e bidimensional foram picotadas e recolhidas em tubos Eppendorf devidamente identificados. As amostras foram lavadas em solução de NH_4HCO_3 e 50 % de acetnitrila para descorar o gel. Foram adicionados 25 μl de ditioneitol (DTT) 10 mM e a amostra foi incubada a 56° C, por 1 hora, para a redução das pontes de sulfeto. Após o descarte do sobrenadante, os resíduos de cisteína foram alquilados usando 25 μl de Iodoacetamida 55 mM, por 45 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. A digestão com tripsina foi realizada a uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas a 37° C. Após esse período, foi recolhido o sobrenadante, onde encontra-se os peptídeos extraídos do gel. A extração de peptídeos foi realizada adicionando 25 μl de uma solução de 50% de acetonitrila e 5 % de ácido trifluoroacético (TFA), por 30 minutos, e o volume foi reduzido até aproximadamente 5 μl em Speed Vac (Eppendorf), não utilizando calor.

15. COLORAÇÃO DOS GÉIS

Os géis foram fixados com metanol 30%, ácido fosfórico 2% (v/v) em água, por 40 minutos e lavados 2 vezes por, 10 minutos, com ácido fosfórico 2% (v/v). Em seguida, os géis foram corados com uma solução contendo ácido fosfórico 2%, metanol 18%, sulfato de amônio 15% e 1% de uma solução contendo 20 g azul de Comassie G-250 por litro de água, durante 72 horas, sob agitação moderada. A coloração foi removida com água.

16. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após hidrólise as amostras dos géis uni e bidimensionais foram misturadas com uma matriz de ácido α -cyano 4-hidroxicinâmico em solução 50 % de acetonitrila e 1 % de ácido trifluoroacético, para então serem analisadas no MALDI-TOF-TOF, para o gel bidimensional, e Q-TOF, para o gel unidimensional. As misturas foram aplicadas na placa (0,7 μ l) e secas à temperatura ambiente. As amostras do gel unidimensional foram analisadas no espectrômetro de massa Q-TOF Ultima API (Waters) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado em Campinas-SP, cuja fonte de ionização é do tipo eletronspray e os analisadores são um quadrupolo e um tempo de vôo. Este equipamento está acoplado a uma coluna de desalinização (Waters Opti-Pak C18 trap column) e uma coluna capilar C18 (Nanoease C18, Waters). As amostras do gel bidimensional foram analisadas no MALDI-TOF-TOF, as massas obtidas por MS/MS foram submetidas à pesquisa no banco de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”).

Nos dois casos, a identificação das proteínas é realizada por MS/MS pela interface do programa MASCOT (Matrix Science), considerando a carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas e oxidação da metionina como modificação variável. Na hidrólise foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídios e dos fragmentos foi de $\pm 1,2$ Da.

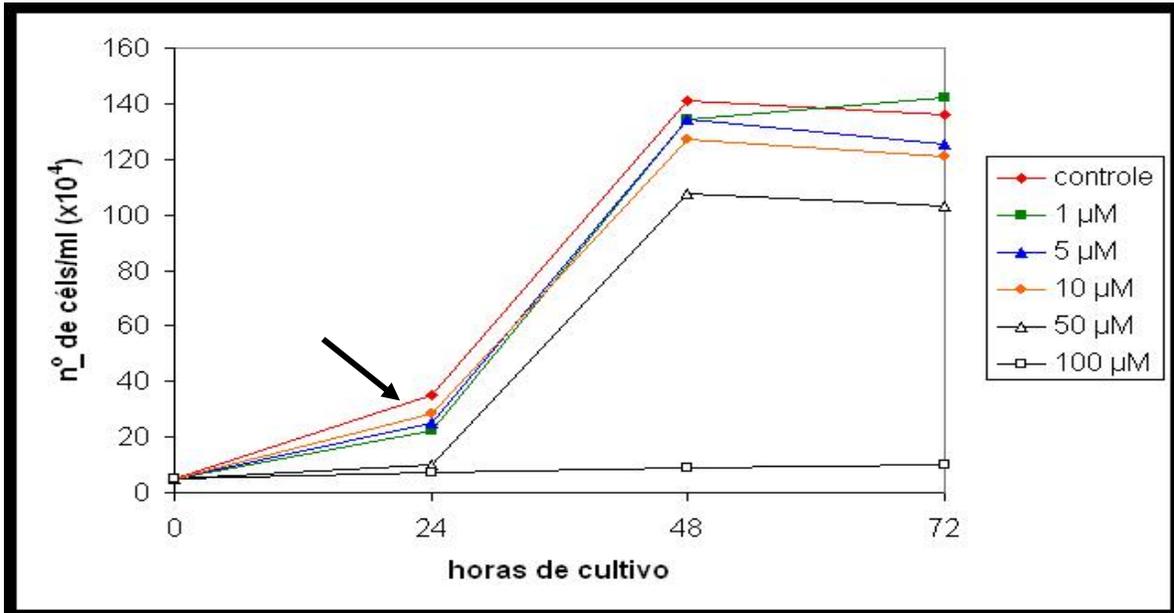
V - RESULTADOS

1. Tratamento com orizalina

1.1 Efeito na proliferação de *Giardia lamblia*

O efeito da orizalina na proliferação de trofozoíto de *Giardia* foi avaliado por uma curva de crescimento (Figura 6a e 6b). A droga inibiu a proliferação de *Giardia* com um IC₅₀ de aproximadamente 75 µM, após 48 h de incubação, de acordo com a curva de inibição da droga (Figura 6b). Com concentrações reduzidas (1, 5 e 10 µM), não observamos efeitos inibitórios significativos. A partir da adição de 50 µM de orizalina observamos um leve declínio no crescimento do parasito, principalmente após 48 horas de cultivo (24 horas após a adição da droga). Na figura 6a, podemos notar que a 100 µM, orizalina inibiu fortemente a multiplicação de *Giardia* logo após a sua adição, continuando muito baixa até 72 horas, demonstrando, assim, um efeito inibitório de proliferaç drástico nessa concentração. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente da orizalina, e foi adicionado, ao controle, na concentração de 0,1%, para evidenciar alguma possível alteração pelo seu efeito tóxico. No entanto, a utilização de DMSO, no controle das curvas, não apresentou nenhuma alteração significativa no crescimento das culturas nem na morfologia celular.

A



B

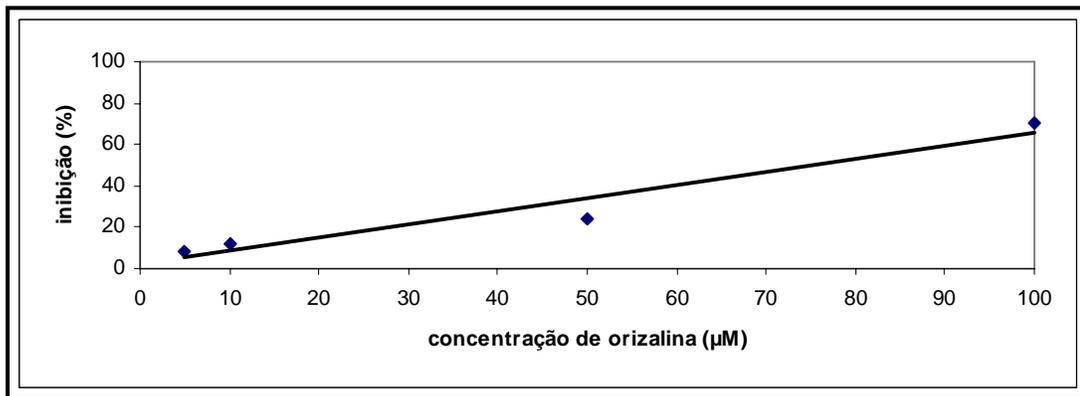


Figura 6: **A:** O crescimento de *G. lamblia* antes e após tratamento com orizalina. A introdução da droga foi realizada após 24 horas de cultura (seta). Após 24 horas de tratamento a proliferação do parasito diminuiu com as concentrações de 50 e 100 μM de orizalina. Com concentrações abaixo de 50 μM não observamos efeitos significativos no crescimento. **B:** Curva de inibição em relação a concentração de orizalina no tempo de 72 horas de cultivo. Podemos observar que o IC_{50} é de aproximadamente 75 μM .

1.2 Alterações na morfologia de *Giardia lamblia*

As dinâmicas celulares em *Giardia* (deslocamento e adesão) foram analisadas previamente em trabalhos do grupo (Campanati *et al.*, 2002), e serviram de parâmetro para o estudo com orizalina. Os efeitos morfológicos encontrados em *Giardia*, após exposição a orizalina, serão mostrados por microscopia eletrônica de transmissão, varredura e por microscopia óptica de fluorescência. A concentração de orizalina utilizada para as análises microscópicas foi de 50 μM , visto que foi a partir dessa concentração que os principais efeitos no citoesqueleto foram evidenciados. Abaixo dessa concentração (1, 5 e 10 μM), além de não encontrarmos efeitos significativos na proliferação do parasito, não observamos por microscopia alterações no citoesqueleto, nosso objeto de estudo. Além disso, com o uso de 100 μM de orizalina poucas células encontravam-se morfolologicamente viáveis para uma análise estrutural. O tempo utilizado para as análises morfológicas foi de 24 horas após a adição da droga (48 horas de cultivo), por ser um tempo onde encontramos células ainda viáveis para observação estrutural.

Após tratamento com 50 e 100 μM de orizalina, por 24 horas, examinamos os efeitos em trofozoítos de *Giardia*, através da microscopia óptica. O controle apresentou morfologia típica (Figura 7 A). Após o tratamento observamos, por contraste interferencial diferencial (DIC), várias células no meio do processo de divisão celular e com o formato do corpo celular alterado (Figura 7 B-E). Através de microscopia óptica de fluorescência, usando para as imunomarcações anticorpos anti α -tubulina, evidenciamos o encurtamento dos flagelos e o alongamento do corpo mediano se comparado às células controle (Figuras 8 e 9). A estrutura dos núcleos não sofreu alterações após o tratamento.

Quando observadas por microscopia eletrônica de varredura, as células tratadas com 50 μM de orizalina, por 24 horas, apresentavam-se com flagelos mais curtos ou com as extremidades

desfeitas (Figura 10). Contudo, não observamos modificações na forma característica de *Giardia* (formato de pêra), nem na superfície celular através da microscopia de varredura. Também, evidenciamos quantidade significativa de células com a divisão celular interrompida (Figuras 11 a 12). Com a técnica de microscopia eletrônica de varredura não foi possível, contudo, observar estruturas microtubulares internas da célula.

Em alguns casos, a microscopia eletrônica de transmissão não é capaz de descrever com detalhes os componentes do citoesqueleto de uma célula. Através da técnica de contrastação negativa as células devem secar em contato com o ambiente trazendo danos a estrutura do citoesqueleto. Com os cortes ultrafinos não é possível “seguir” uma estrutura, e assim não podemos analisar as interações do citoesqueleto. Assim, trofozoítos de *Giardia* tratados com orizalina, após extração da membrana, foram examinados por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FESEM). Essa ferramenta nos permite fazer imagens do citoesqueleto, após a extração da membrana, com grande qualidade (Sant’Anna *et al.*, 2005). Após o tratamento com 50 μM de orizalina por 24 horas, observamos os flagelos desarranjados e curtos (Figuras 13 e 14). O disco ventral não demonstrou alteração, continuando com sua forma característica, sendo que a estrutura em espiral dos microtúbulos do disco não foi modificada. Através da observação por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução não encontramos alterações no funis (Figura 13 B).

Podemos observar na figura 15 uma micrografia eletrônica de trofozoítos de *Giardia lamblia* em corte transversal, demonstrando suas estruturas principais, como os dois núcleos, os quatro pares de flagelos, o disco ventral e as vesículas periféricas, distribuídas pela periferia celular. Células tratadas com 50 e 100 μM de orizalina, por 24 horas, foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. O corpo mediano mostrou-se alongado, e em algumas células, muito próximo à membrana (Figura 16 A). Trofozoítos tratados com 100 μM da droga apresentaram dificuldade na divisão celular, com muitos flagelos evidenciados, além de uma desorganização das vesículas

periféricas (figuras 16 B e 17). Contudo, não observamos modificações na estrutura do disco ventral (Figura 16 A).

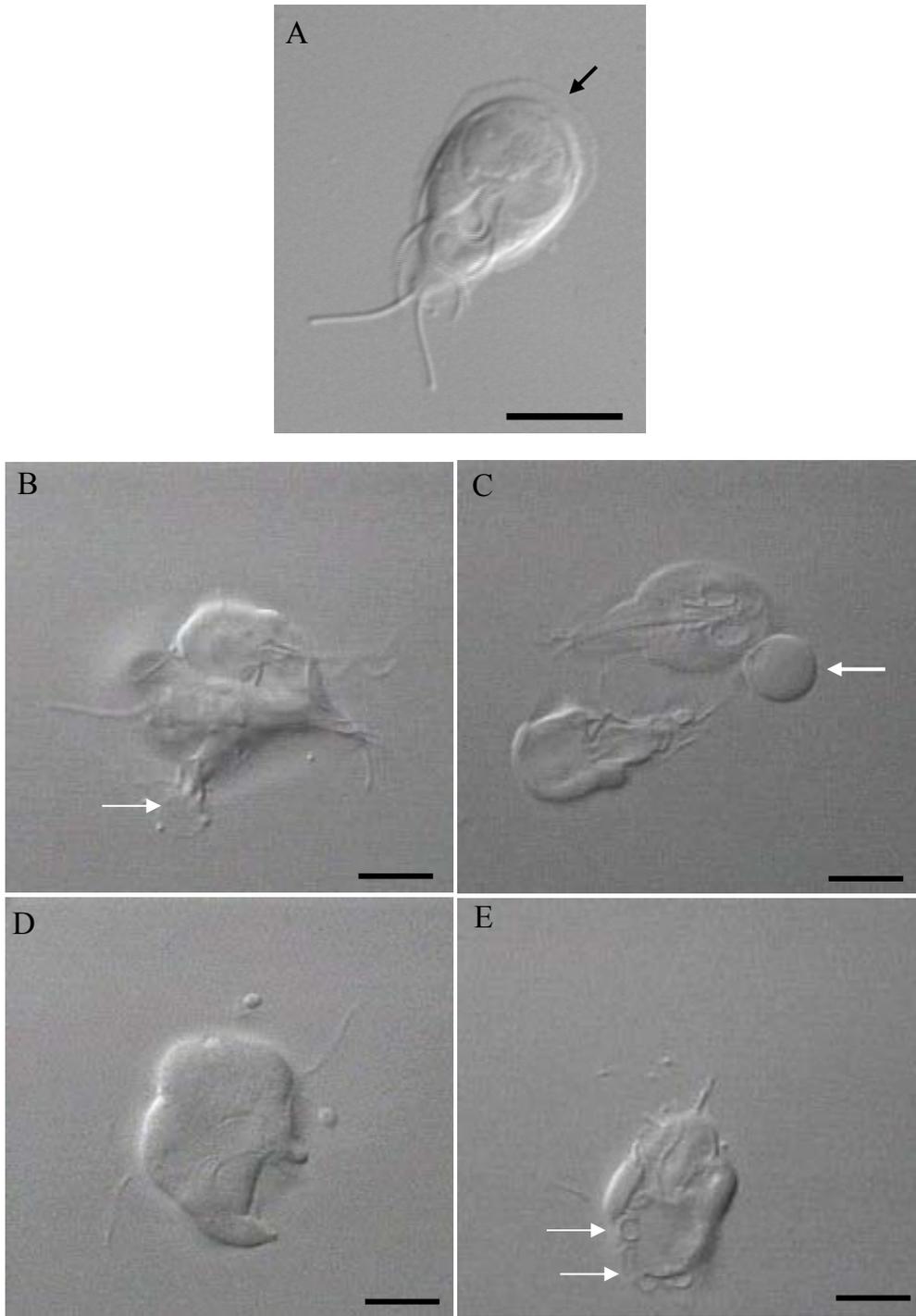


Figura 7: **A:** Microscopia óptica de contraste interferencial diferencial (DIC) mostrando trofozoíto controle de *G. lamblia*. Podemos observar os quatro pares de flagelos com sua forma típica, além da flange ventro lateral (seta). Barra: 3 µm. Trofozoítos tratados com 50 µM de orizalina. Células com processo de divisão interrompido (**B** e **D**). Forma alterada do corpo celular e dos flagelos (setas) (**C** e **E**). Barra: 3 µm.

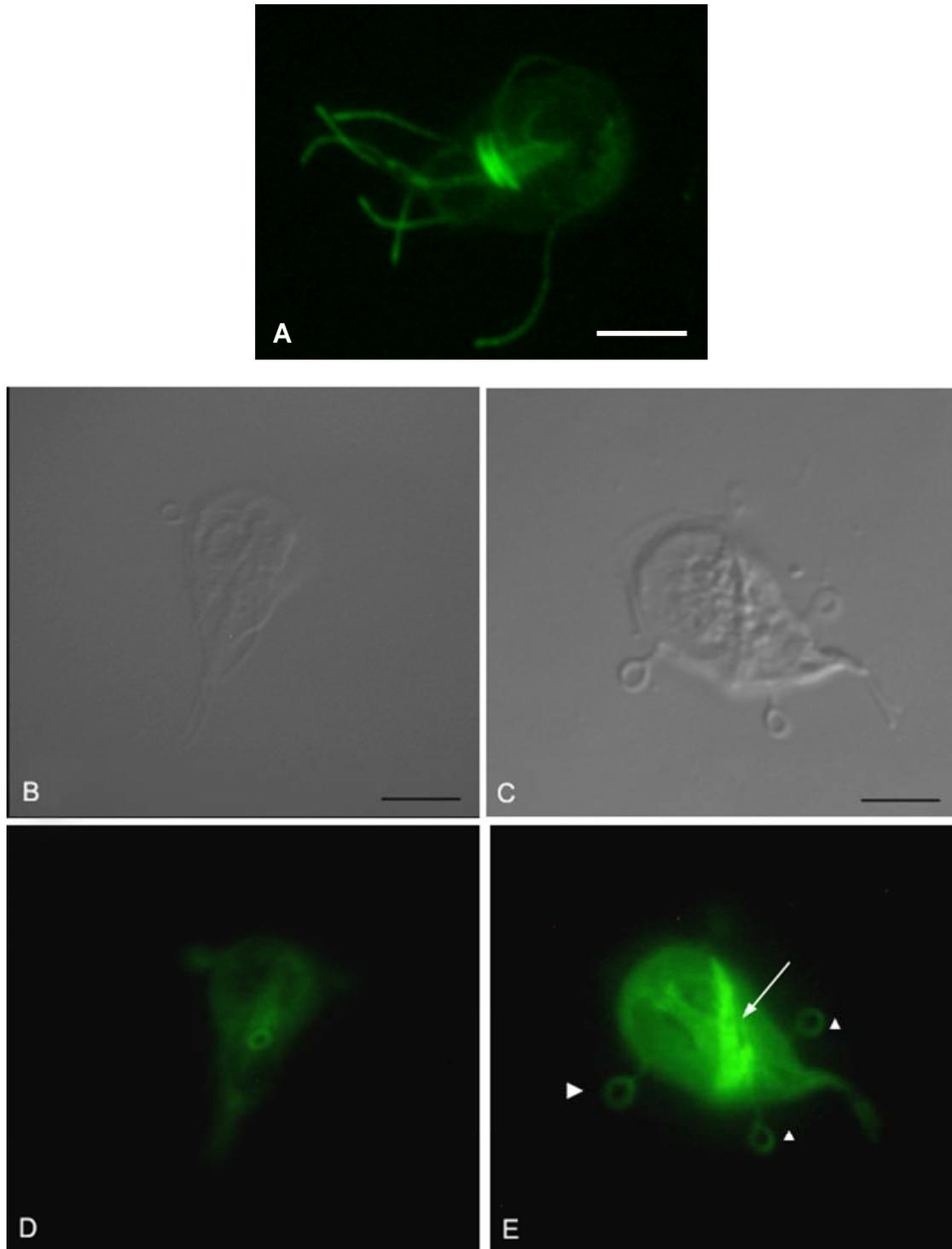


Figura 8: **A:** Imunofluorescências de trofozoítos de *G. lamblia* controle. Barra: 2,5 μ m. **B-E:** Imunofluorescências de trofozoítos de *Giardia lamblia* após tratamento com 50 μ M de orizalina por 24 horas. **B e C :** Contraste Interferencial Diferencial (DIC). Em **D e E** podemos observar o alongamento do corpo mediano (seta) e o encurtamento dos flagelos (cabeça de seta). Não observamos modificações no núcleo e na forma do corpo celular. Barras: 2,5 μ m.

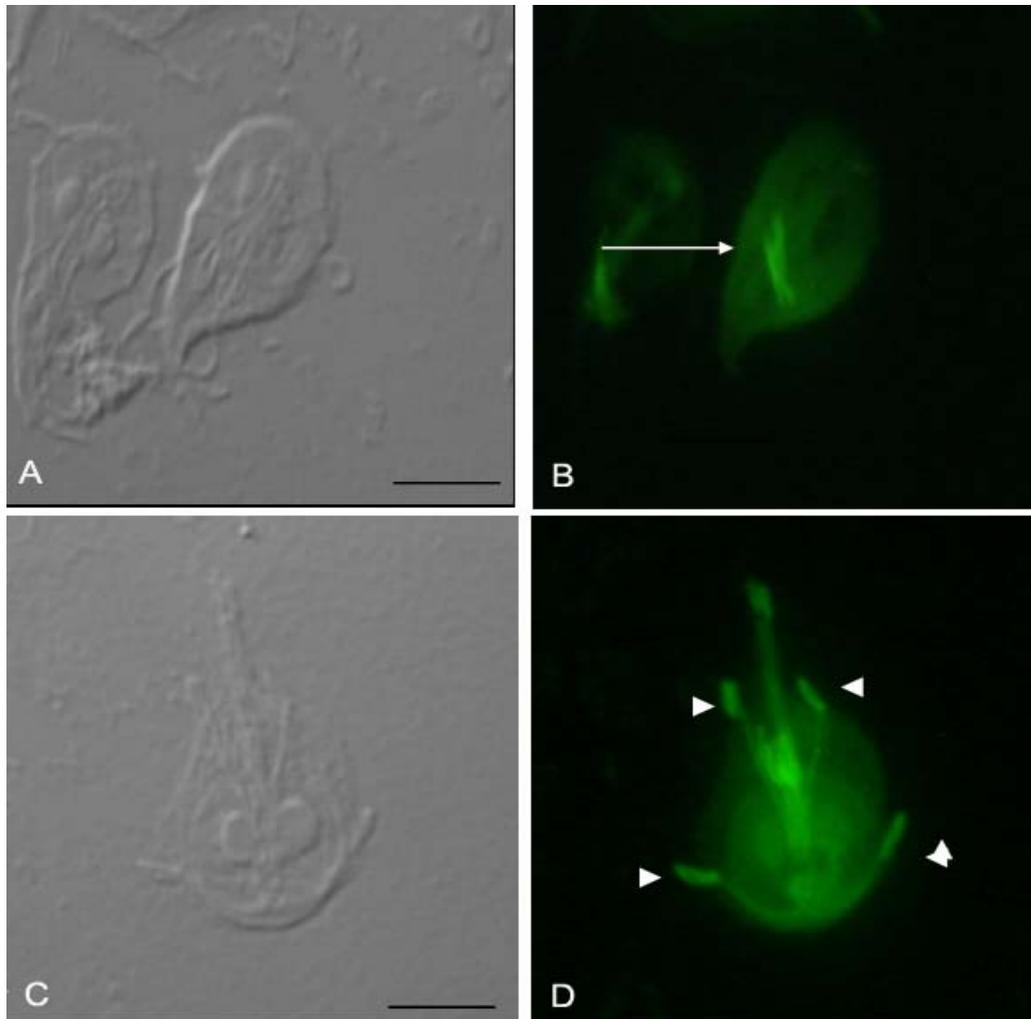


Figura 9: Imunofluorescências de trofozoítos de *G. lamblia* após tratamento com 100 μM de orizalina por 24 horas. **A** e **C** : Contraste Interferencial Diferencial (DIC). Em **B** e **D**: o corpo mediano encontra-se alongado (setas) e os flagelos anteriores, posteriores, ventrais e caudais estão mais curtos (cabeça de seta). Barras: 2,5 μm .

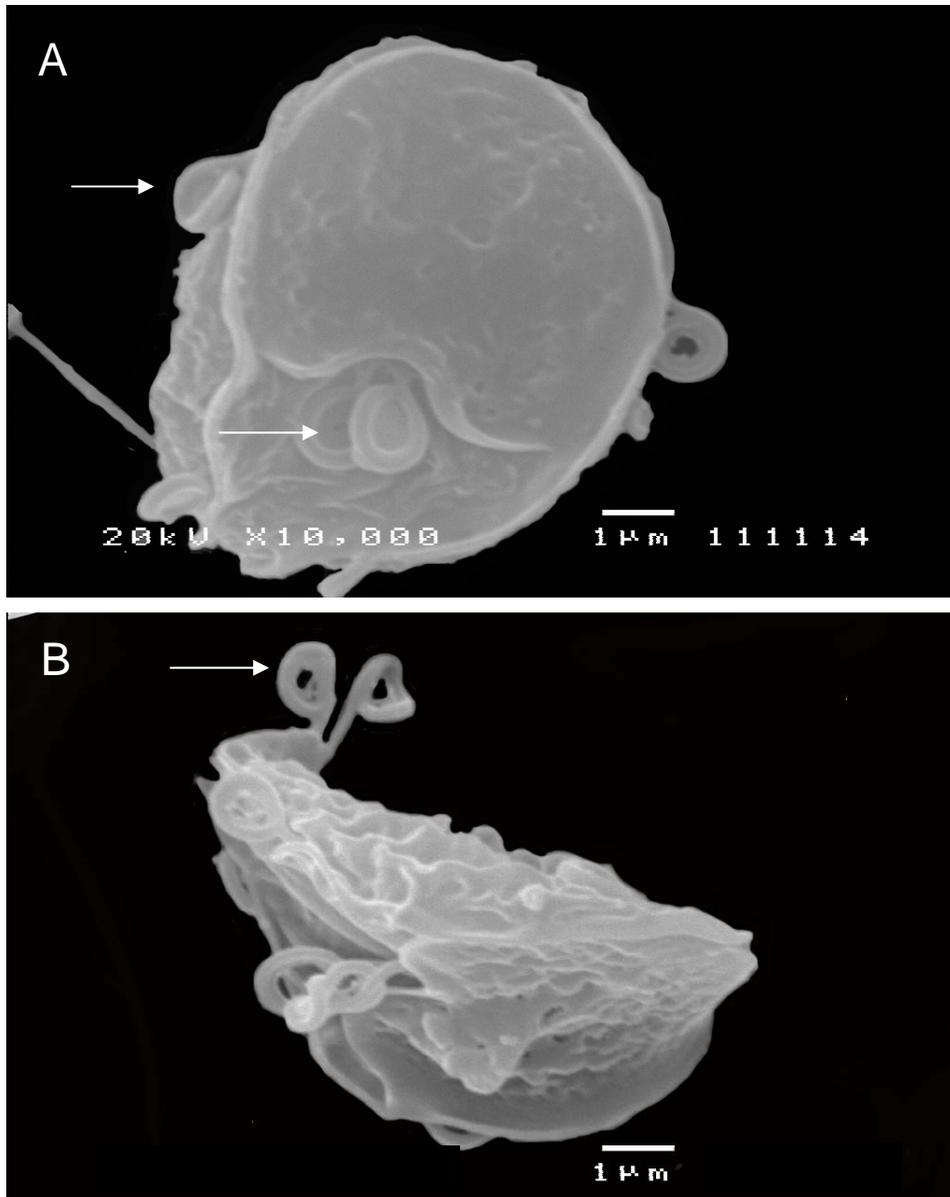


Figura 10: Micrografia eletrônica de varredura de *G. lamblia* após tratamento com 50 μ M de orizalina. Em **A** e **B** podemos observar o encurtamento dos flagelos anteriores, posteriores, ventrais e caudais (setas). Aumento indicado nas imagens.

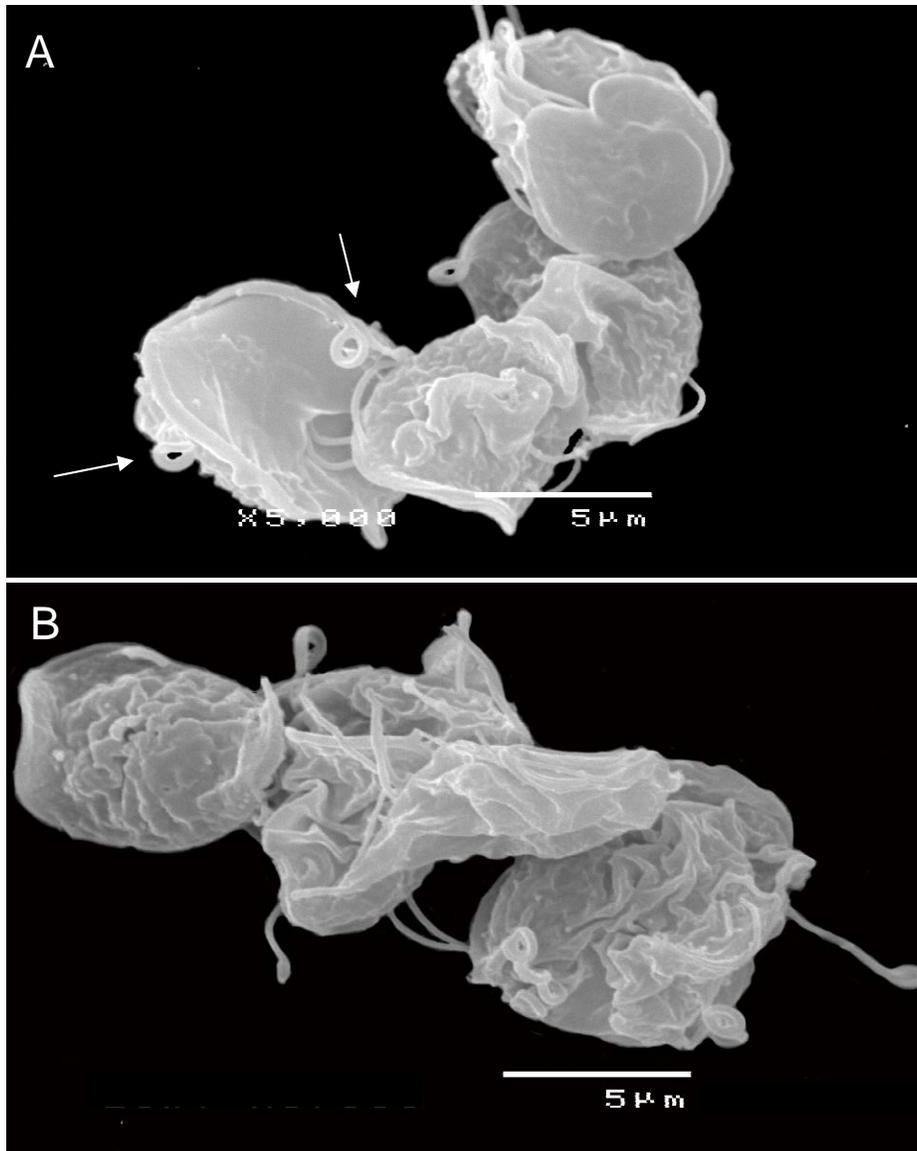


Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura de *G. lamblia* após tratamento com 50 μ M de orizalina. Em **A** e **B** podemos observar o encurtamento dos flagelos anteriores (setas); As células não conseguem completar a divisão celular. Não identificamos alterações na superfície celular. Aumento indicado nas imagens.

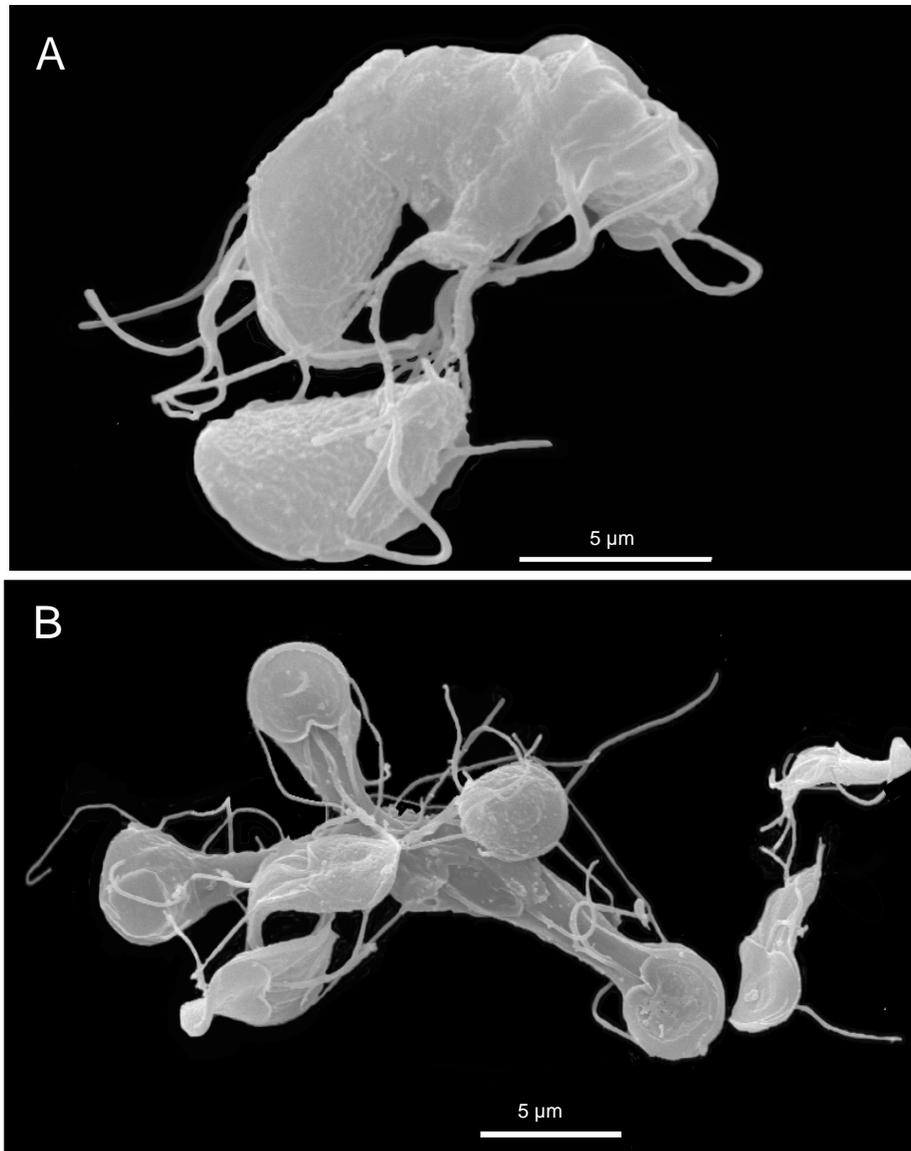


Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura de *G. lamblia* após tratamento com 50 µM de orizalina. Em **A** e **B** podemos observar que as células não conseguem completar a divisão celular. Aumento indicado nas imagens.

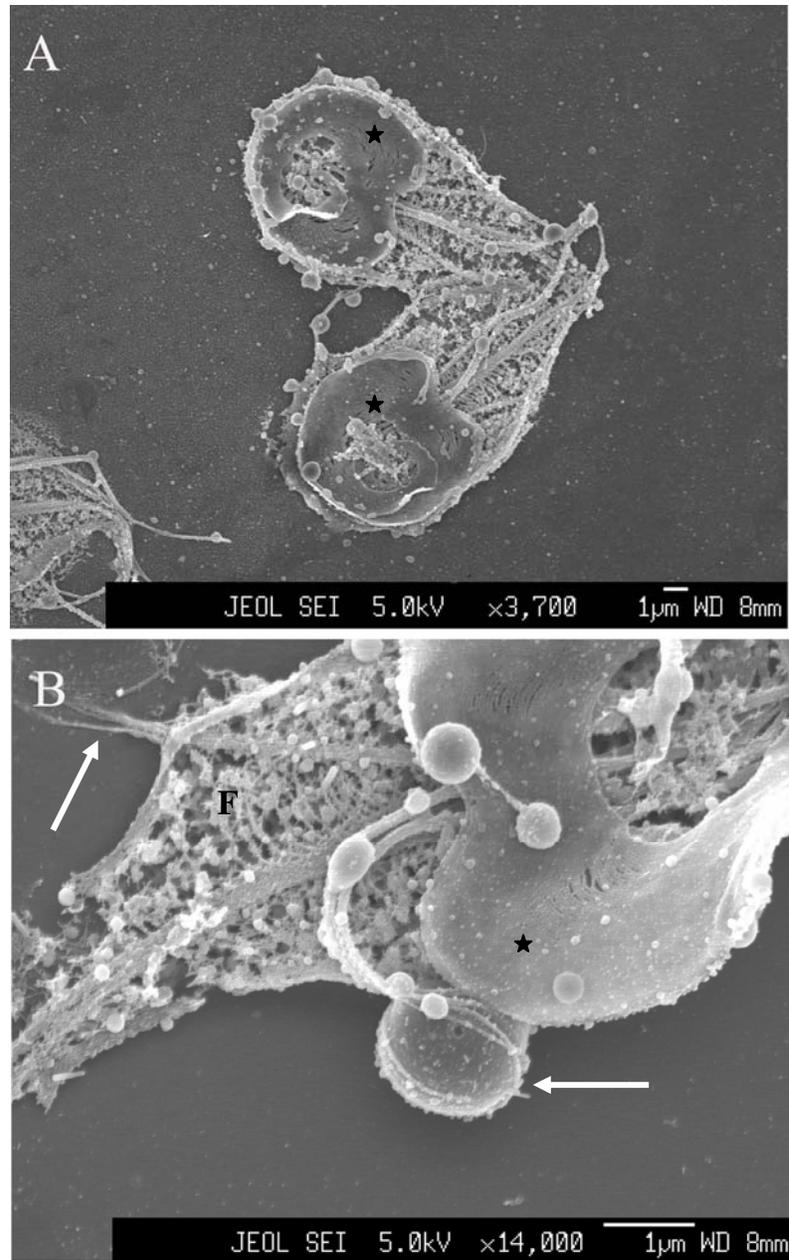


Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) de *G. lamblia* após tratamento com 50 µM de orizalina por, 24 horas. A membrana dos trofozoítos foi extraída com detergente NP-40. Em **A** podemos observar a preservação da forma do corpo celular e do disco ventral. **B**: desorganização dos flagelos posteriores e ventrais (setas); o disco ventral não sofreu alterações (*). F: funis ★

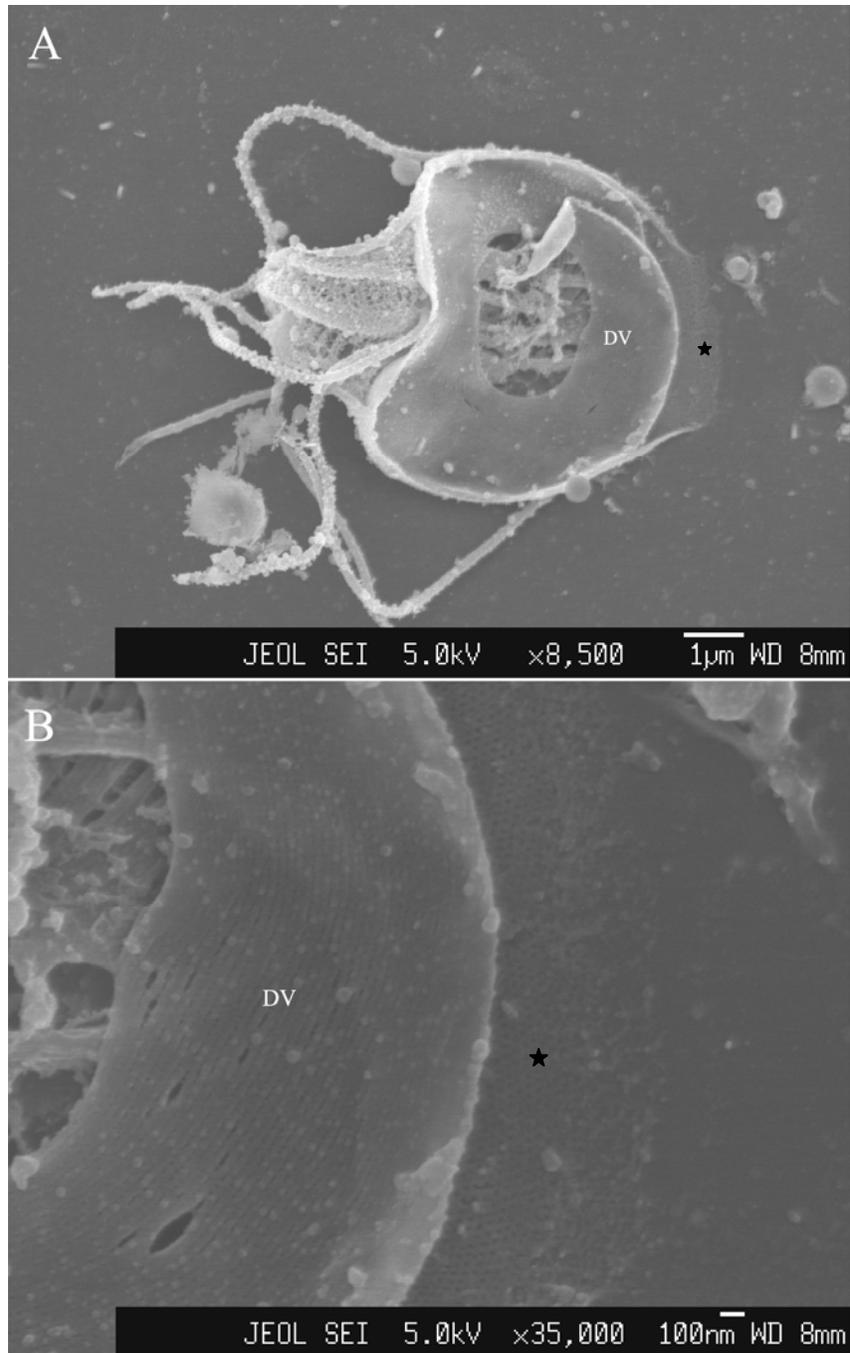


Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) de *G. lamblia* após tratamento com 50 µM de orizalina por 24 horas. Nessa micrografia podemos observar o disco ventral (DV) intacto e a placa paracristalina preservada (★), mesmo após tratamento com detergente.

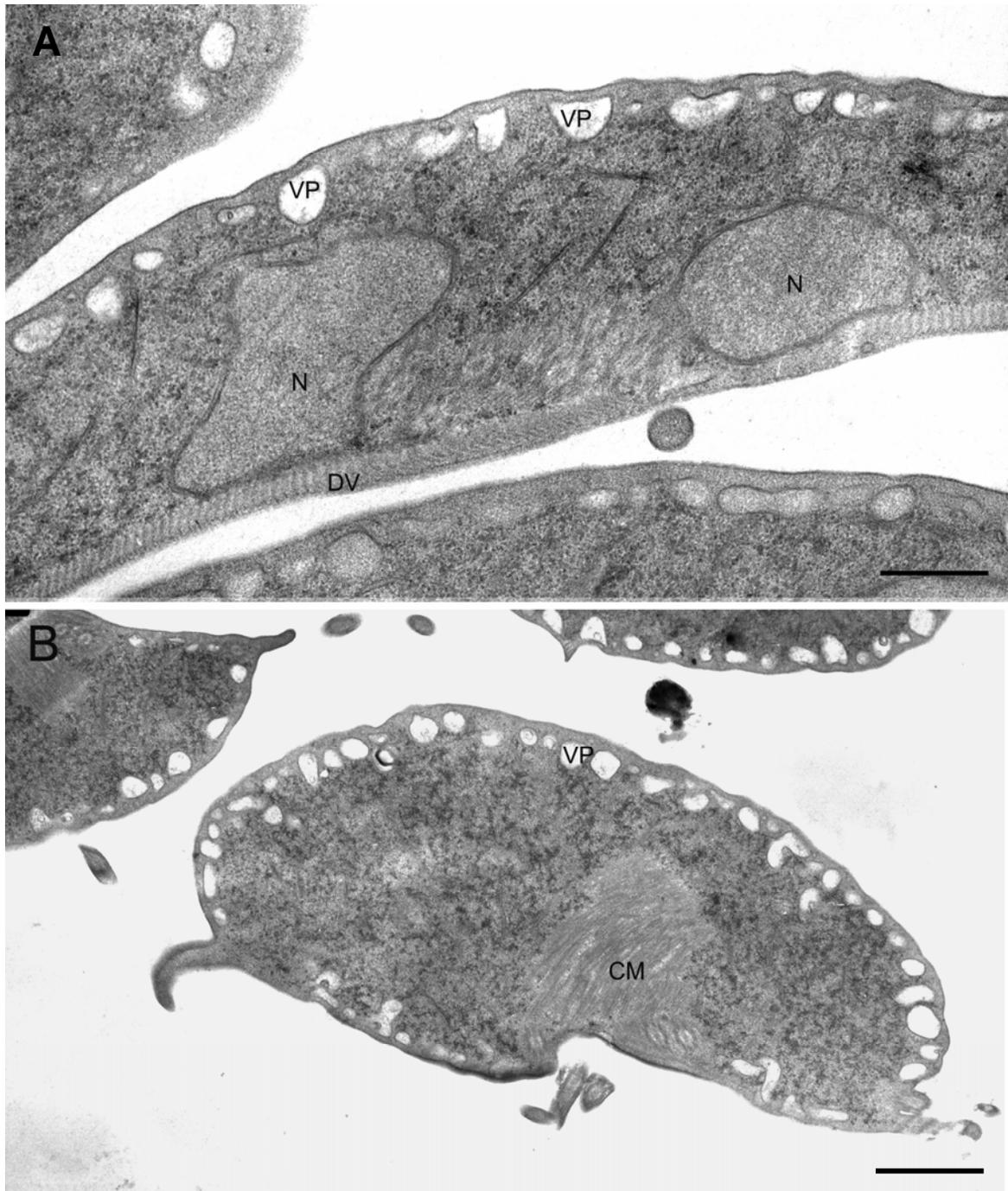


Figura 15: Micrografias eletrônicas de transmissão demonstrando corte transversal de trofozoítos de *G. lamblia* controle. N: Núcleo; DV: disco ventral; VP: vesículas periféricas, CM: corpo mediano. Barras = A: 1 μ m; B: Barra = 0,5 μ m.

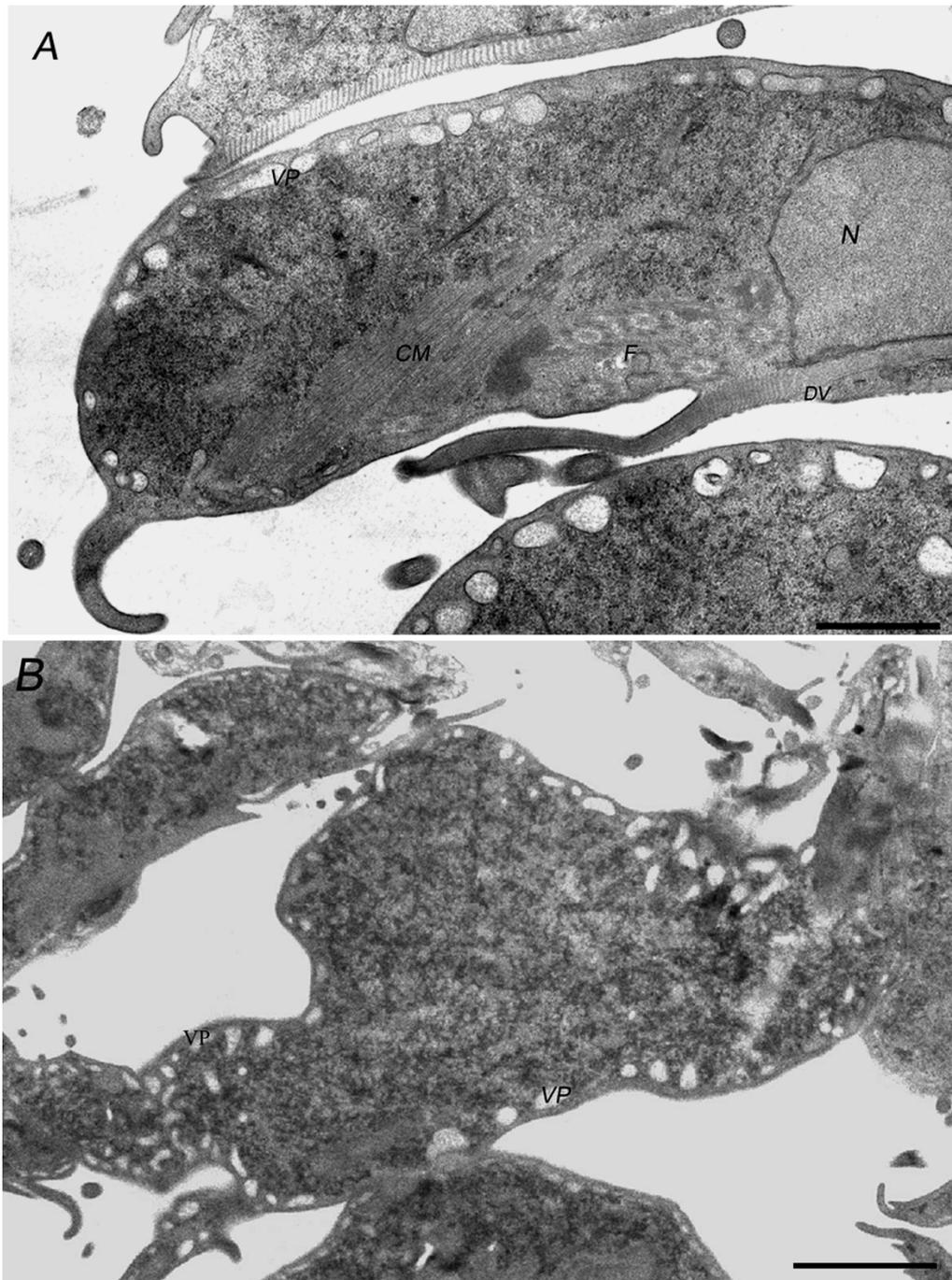


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando trofozoítos tratados com orizalina. **A:** *G. lamblia* após tratamento com 50 µM de orizalina, por 24 horas. O disco ventral, as vesículas periféricas e os núcleos não sofreram alterações. **B:** trofozoítos após tratamento com 100 µM de orizalina, por 24 horas. Podemos observar a forma anormal de trofozoítos (*clusters*) e a desorganização das vesículas periféricas (VP). DV: disco ventral; F: flagelos; CM: corpo mediano; N: Núcleo; VP: vesículas periféricas. Barras: 2 µm

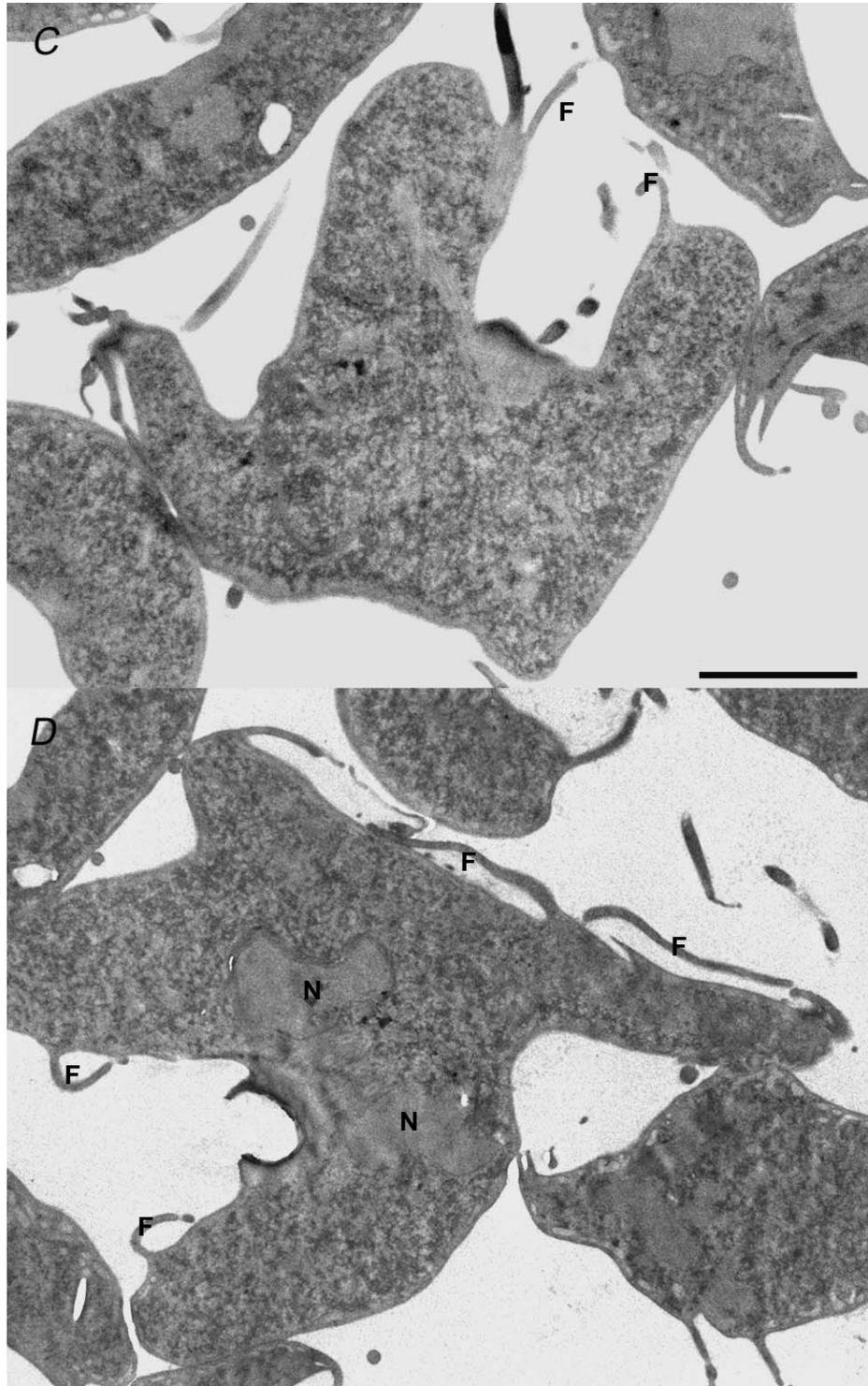


Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão mostrando trofozoítos tratados com orizalina. **C e D:** *G. lamblia* após tratamento com 100 μ M de orizalina por 24 horas. Podemos observar o tamanho e a forma anormal de trofozoítos. Em **D**, podemos observar a presença de vários flagelos (F). N; núcleo. Barras: 2 μ m

1.3 Síntese de Tubulina

Como a orizalina causa instabilidade dos microtúbulos, interagindo de forma específica com a tubulina, amostras de trofozoítos não tratados e tratados foram submetidas à corrida eletroforética para comparação da expressão de tubulina (Figura 18). Foi comparada a expressão de tubulina em células não tratadas (controle) e tratadas com 50 e 100 μM de orizalina. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, foi realizada a incubação com anticorpo α -tubulina TAT-1. Com o controle de carregamento podemos garantir que foi adicionada a mesma quantidade de proteínas para todas as amostras (Figura 18 B). Não houve alteração no nível de tubulina produzida após o tratamento com orizalina, como podemos observar na Figura 18 A. Esses resultados indicam que não houve alteração na síntese de tubulina pela célula.



Figura 18: Análise por Imunoeletroforese após tratamento com Orizalina. Anticorpo α -tubulina TAT-1. **A:** Aplicação de 10 μ g de proteína. Controle, após tratamento com 50 μ M e 100 μ M; **B:** Controle de carregamento após marcação com Ponceau.

2. Disco ventral

2.1 Isolamento do disco ventral

Ao reproduzir os protocolos de isolamento do citoesqueleto de *Giardia* (Holberton e Ward, 1981), encontramos algumas dificuldades, como o tempo de exposição ao detergente e tempo de agitação da amostra, e o fato de ainda encontrarmos flagelos “ligados” ao disco. Tendo em vista superar as dificuldades, um novo protocolo foi adaptado para o isolamento do disco ventral.

No protocolo desenvolvido, as células foram ressuspensas em PHEM, utilizado para melhor preservação do citoesqueleto. O tempo de exposição ao tampão e ao detergente Triton X-100 foi reduzido para 10 minutos. O modo e o tempo de agitação do material também foram alterados: ao invés do uso do vortex, utilizamos o sonicador para romper a célula, em períodos de 10 a 15 segundos.

Através desse novo protocolo obtivemos frações purificadas de disco ventral. A quantidade de discos isolados mostrou-se maior, comparada aos protocolos anteriores (Holberton e Ward, 1981). Após preparação e contrastação do material, comprovamos a pureza das frações obtidas por fracionamento (Figura 19). Nos cortes ultrafinos, identificamos a estrutura isolada e intacta dos microtúbulos e das microfitas por microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 20 a 22). A microscopia de força atômica (AFM) vem sendo usada para estudos em ciências biológicas, principalmente, por possibilitar análises de material biológico com suas condições naturais preservadas (Rocha *et al.*, 2007; Berdyeva *et al.*, 2005; Cidade *et al.*, 2003). A AFM permite observar estruturas do citoesqueleto após o uso de detergente, sem deteriorar a amostra, e por ser uma técnica capaz de apresentar imagens 3D, podemos observar o citoesqueleto com densidade e volume (Berdyeva *et al.*, 2005). Através da AFM analisamos trofozoítos e o disco ventral de

Giardia. Podemos observar trofozoítos (após a extração da membrana) com sua forma característica e as principais estruturas do citoesqueleto, como os quatros pares de flagelos e o disco ventral (Figura 23 A). Observamos a estrutura do disco isolado, evidenciando a rede de microtúbulos que o constituem (Figura 23 B). Identificamos também, no centro do disco, a “zona nua”, sendo possível reconhecer os corpos basais nessa área, localizados próximos aos axonemas dos flagelos ventrais, ainda “ligados” ao disco (Figura 23 B).

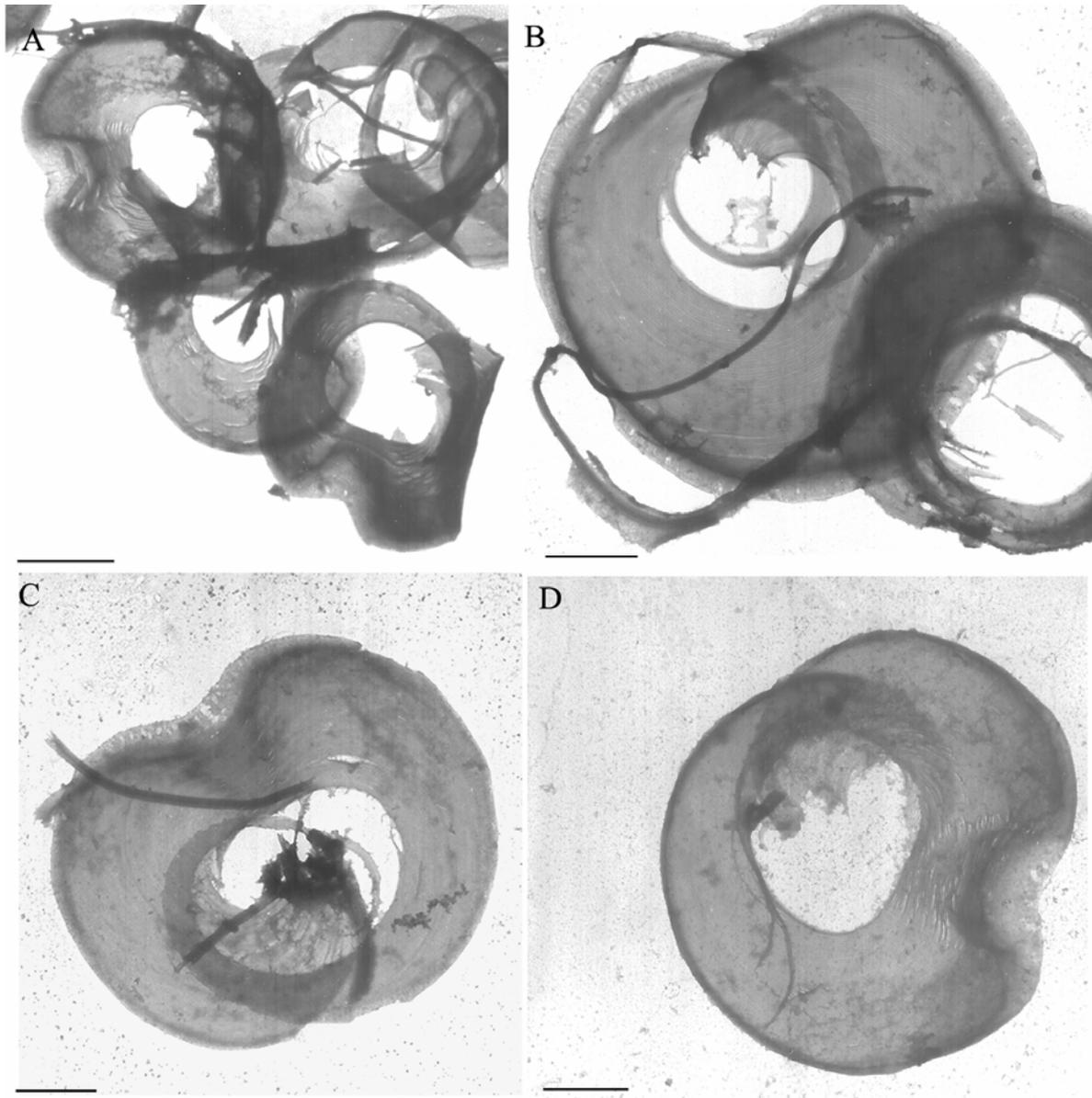


Figura 19: Contrastação por molibdato de amônio de disco ventral isolado de *G. lamblia*. Observamos o disco ventral sem outras estruturas do citoesqueleto a ele “ligadas”. Em **A** podemos observar um maior número de discos isolados. **B**, **C** e **D**: maior aumento da fração de disco ventral. Barra 3 µm. Barra: 1 µm.

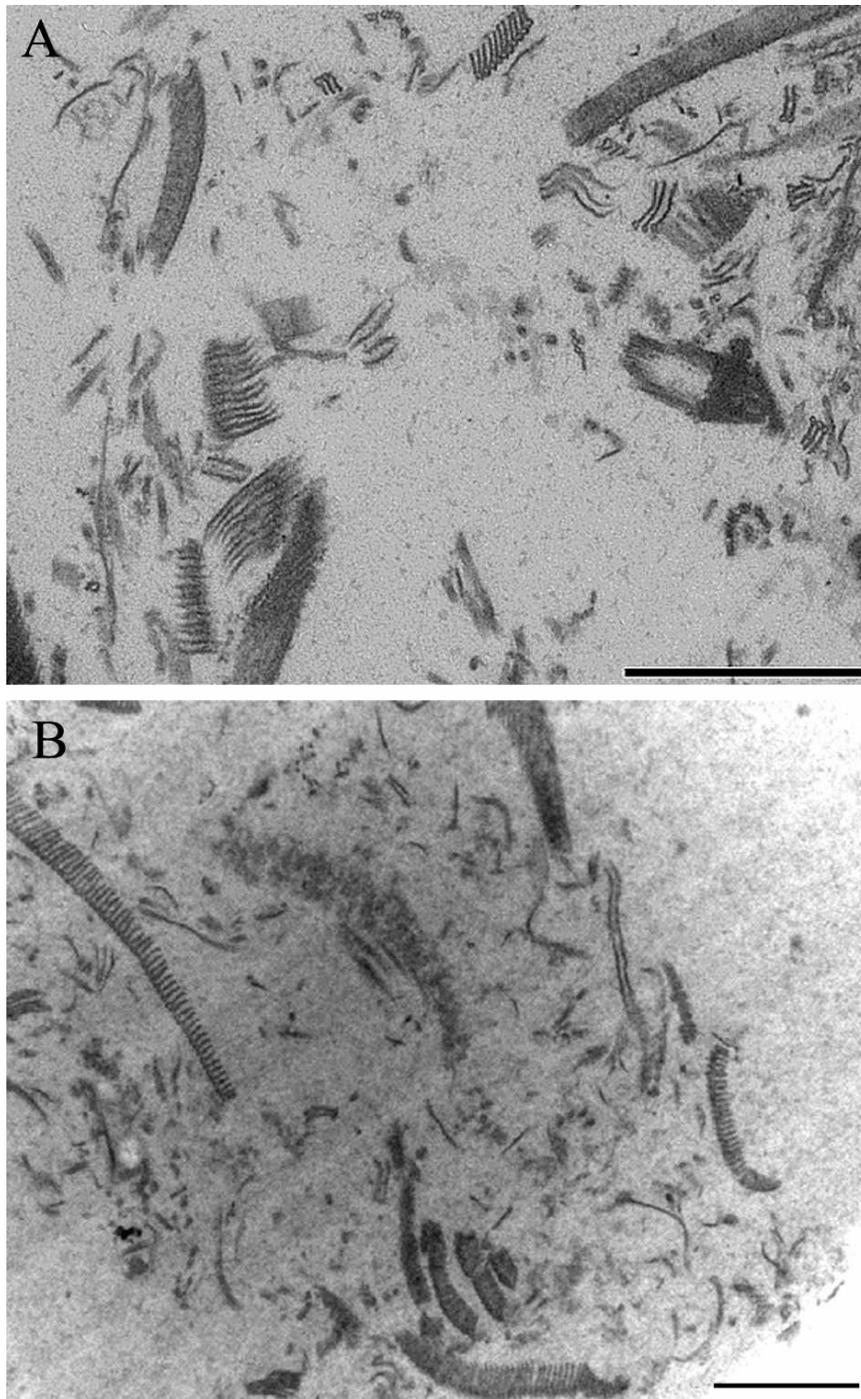


Figura 20: Micrografia eletrônica de transmissão mostrando discos ventrais isolados de *G. lamblia*. Podemos observar a pureza do material obtido após fracionamento. Barra: 1 μ m.

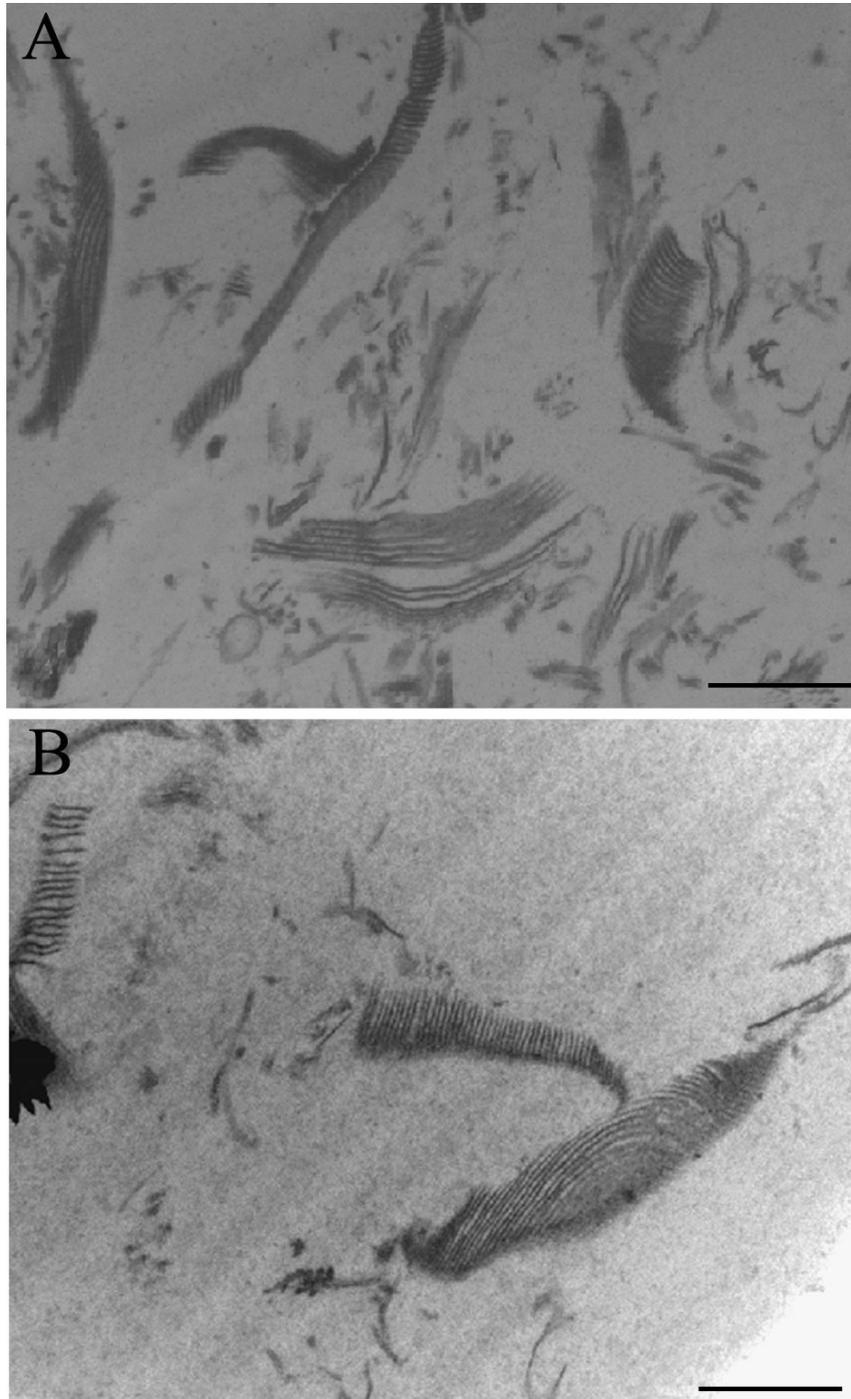


Figura 21: Micrografia eletrônica de transmissão mostrando discos ventrais isolados de *G. lamblia*. A: Diferentes planos de corte do disco ventral. Podemos observar a pureza do material obtido após fracionamento. Barra: 1 μm .

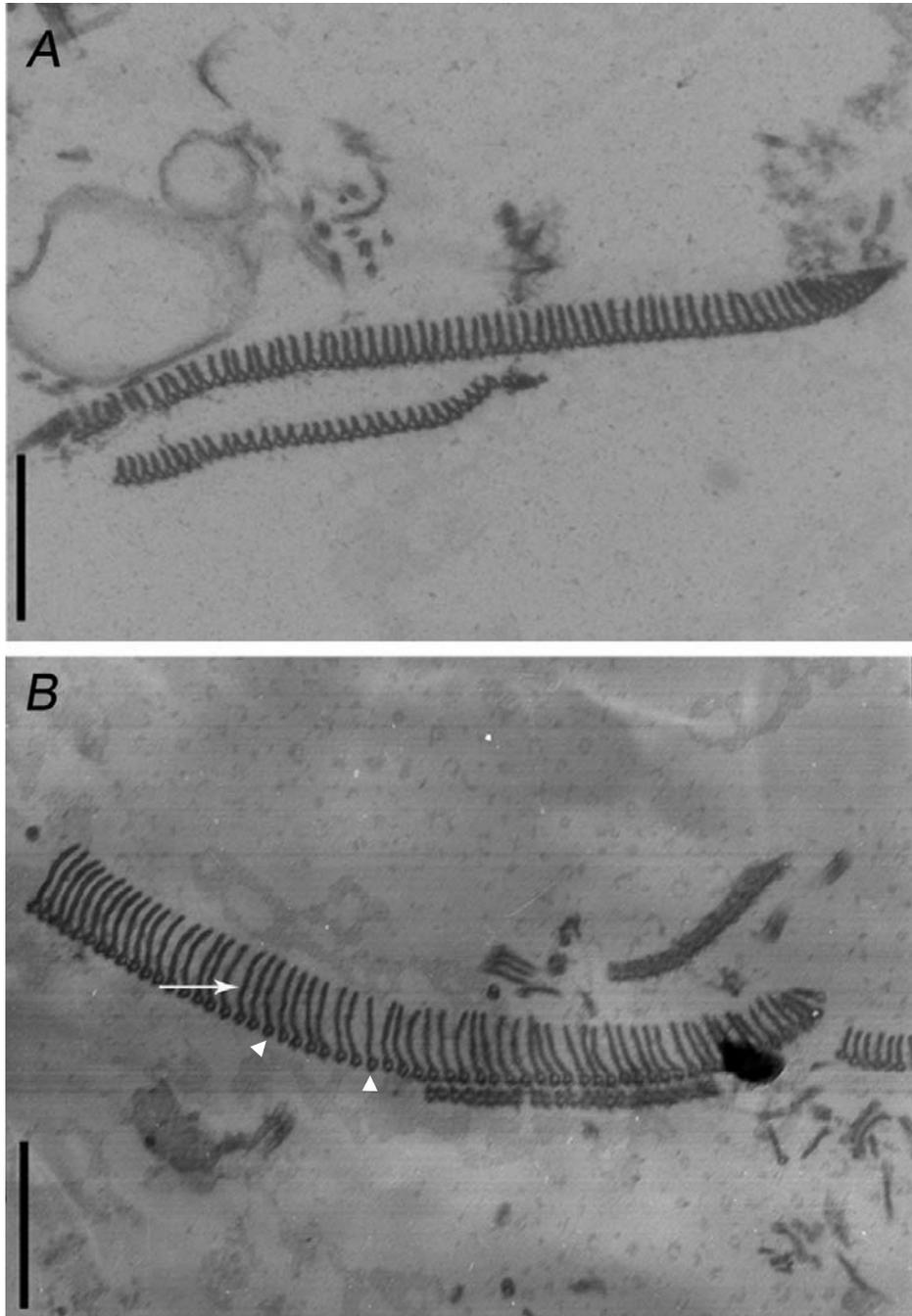


Figura 22: Micrografia eletrônica de transmissão mostrando discos ventrais isolados de *G. lamblia*. **A** e **B**: podemos observar um maior aumento da estrutura do disco, mostrando a disposição dos microtúbulos (cabeça de seta) e das microfibras (seta).

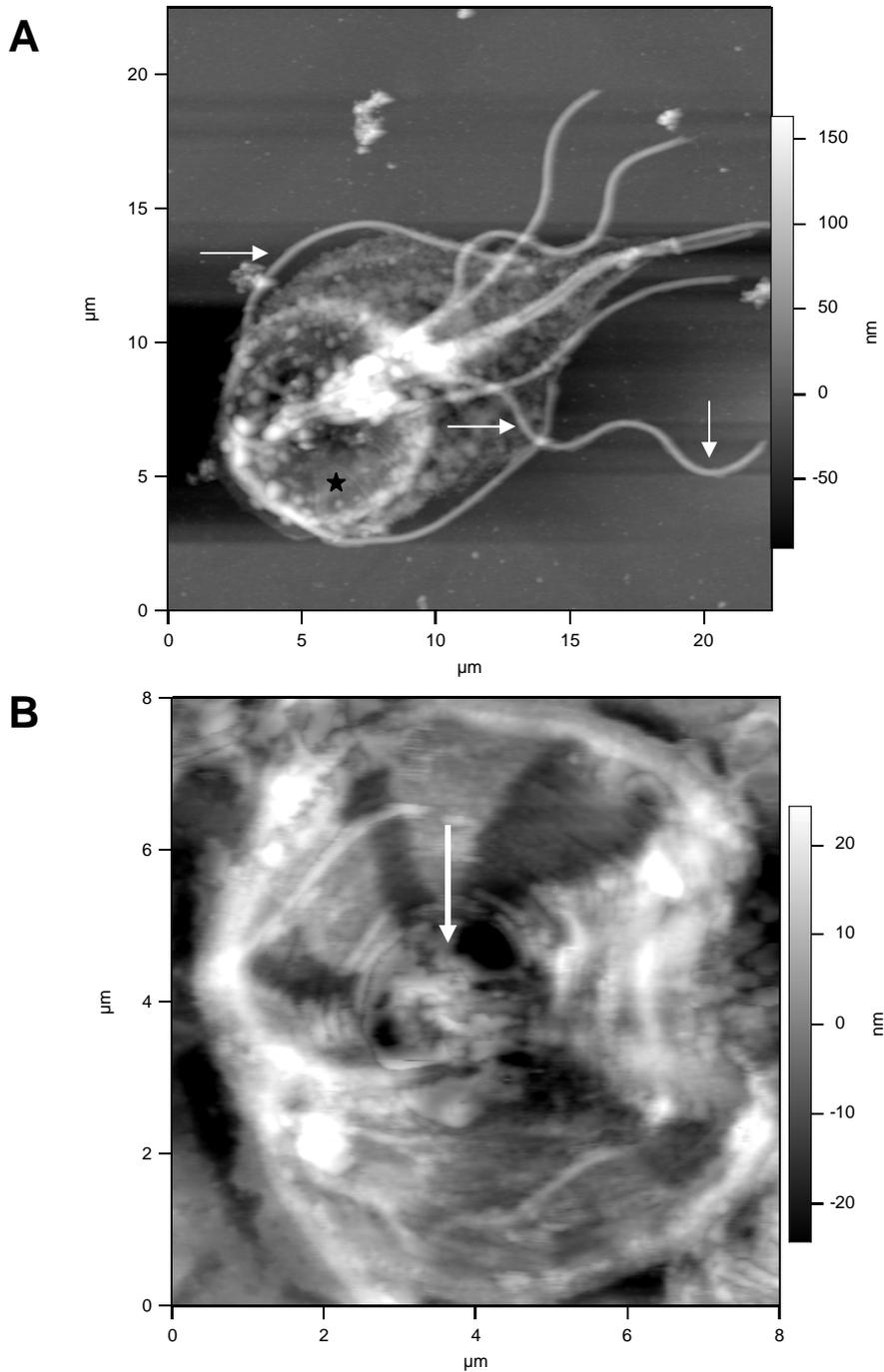


Figura 23: Imagem de Microscopia de Força Atômica. **A:** trofozoítos após a extração de membrana. Podemos observar as principais estruturas do citoesqueleto de *Giardia*, como os quatro pares de flagelos (setas) e o disco ventral (★) **B:** amostra coletada durante o processo de isolamento do disco ventral. Podemos observar a “zona nua” (seta) observamos os corpos basais, que são estruturas de onde partem os flagelos.

2.2 Proteômica do Disco ventral

Com o intuito de se identificar as proteínas residentes no disco ventral de *Giardia*, a amostra obtida após o isolamento do disco foram visualizadas em gel unidimensional SDS-PAGE 7,5 % (Figura 24). O padrão de proteínas totais de trofozoítos também foi observado (Figura 24, lane 1). O perfil protéico de discos ventrais isolados por fracionamento de *G. lamblia* apresentou 4 bandas predominantes na faixa de peso molecular de 25 a 58 KDa (Figura 24, lane 2). Foram encontradas proteínas já conhecidas do citoesqueleto de *Giardia* com peso molecular característico de tubulinas (aproximadamente 40 KDa) e giardinas (aproximadamente 30 KDa).

A amostra de disco ventral isolado foi submetida à corrida eletroforética bi-dimensional. Aproximadamente 18 *spots* (pontos) foram encontrados majoritariamente na região de pH neutro (Figura 25). Encontramos um grupo de 7 proteínas na faixa de 30 a 58 KDa de peso molecular. Um outro grupo de 8 proteínas, com peso molecular inferior a 24 KDa foi observado.

Realizamos a análise proteômica por cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massa, através dos géis de poliacrilamida uni e bidimensionais. Após a digestão por tripsina, as 4 bandas predominantes encontradas no gel 1D e os 18 *spots* do gel 2D foram submetidas à análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS). Os resultados a partir da espectrometria de massa podem ser visualizados na Tabela 1. Cinco proteínas foram encontradas a partir das quatro bandas utilizadas do gel 1D. Três dessas proteínas, alpha-tubulina, gama-giardina e beta tubulina 1, já foram identificadas no citoesqueleto de *Giardia*. Uma, a proteína hipotética bovina, provavelmente advém do soro bovino adulto, utilizado na cultura do parasito. A GLP_82, que corresponde à família de proteínas responsáveis pela ativação

transcricional, apesar de estar anotada no genoma de *Giardia*, ainda não tinha sido evidenciada no disco ventral (Chin-Hung *et al.*, 2006).

A partir do gel 2D, das oito proteínas identificadas, apenas 4 *spots* correspondem a proteínas anotadas no genoma de *Giardia lamblia*, correspondendo a proteína de corpo mediano, SALP-1, delta giardina e gamma giardina. Duas proteínas, identificadas como Mp1p-like protein 10 (*Penicillium marneffeii*) e Hypothetical protein TTHERM (*Tetrahymena thermophila* SB210), apesar de serem identificadas no *spot* 9 com um *score* elevado (79 e 63 respectivamente), não correspondem a proteínas encontradas no genoma de *Giardia lamblia*. Algumas proteínas são encontradas no soro e meio de cultivo do parasito, como a albumina bovina e a caseína Alpha 51, sendo uma provável contaminação durante o isolamento do disco ventral.

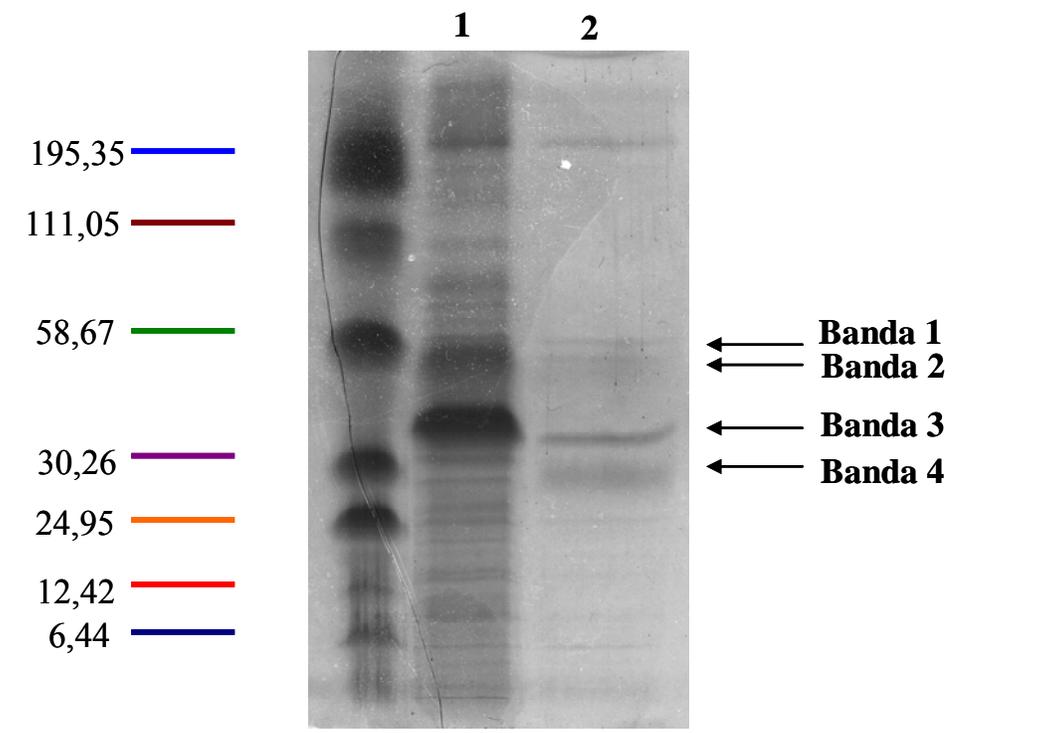


Figura 24: Eletroforese unidimensional de extrato protéico de *G. lamblia*. **1:** proteínas totais. **2:** extrato de disco ventral isolado. As proteínas predominantes (Bandas 1, 2,3 e 4) foram identificadas a partir dos espectros de massas gerados pelo Q-TOF.

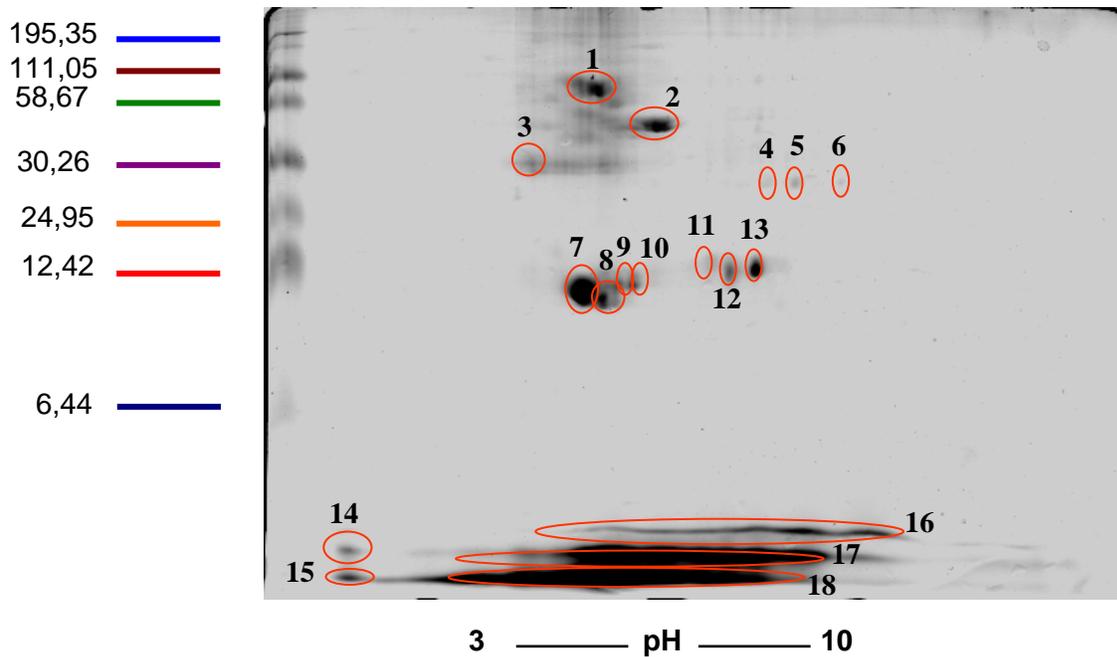


Figura 25: Eletroforese 2D de proteínas correspondendo a fração de disco ventral isolado de *G. lamblia*. O padrão de peso molecular e os pontos isoelétricos utilizados estão destacados na figura. Adição de 100 µg de proteína. Identificação de 18 *spots* que posteriormente foram identificados a partir dos espectros de massas gerados pelo MALDI-TOF-TOF.

Tabela 1

Proteínas identificadas na proteômica da fração de disco ventral de *Giardia lamblia*

Tipo do gel ¹	Banda/Spot	NCBI ²	Identificação	Score ³	PM (KDa/pI) ⁴	Peptídeos representativos ⁵	Referências
1D	1	Q7R3R8_GIALA Q2HJB8_BOVIN	GLP_82_78422_77079.- <i>Giardia lamblia</i>	136	50701/4.77	R.INVYFNEAAGGR.Y R.FPGQLNADLRK.L K.LAVNLIPFPR.L R.VGEQFTAMFR.R	Chin-Hung <i>et al.</i> , 2006 (GLP 1 e 2) Keister, 1983
			Hypothetical protein.- <i>Bos taurus</i> (Bovine)	82	50706/5.06	R.AVMVDLEPTVVDEVR.A R.NLDIERPTYTNLNR.L	
1D	2	Q8I856_GIALA	Alpha-tubulin	180	49617/5.35	R.AVFDVLEPTVVDEVR.A R.QLYHPEQLISGKEDAANNYAR.G R.NLDIERPTYTNLNR.L R.LIAQCISSITASLR.F	Palm t <i>al.</i> , 2005
1D e 2D	3 13	S25163 gi 159112089	gamma-giardin	145	35667/6.48	K.MFQDHMVNDFRPK.F R.HGLQTEINSLEAIIER.E R.LNQEVSNFKESFDASER.N	Palm t <i>al.</i> , 2005
				58	35667/6.48	K.AFDAENADDFVGK.T R.HGLQTEINSLEAIIER.E	
1D	4	Q2KT53_9STRA	Beta tubulin 1	50	26849/6.50	K.IAVNLIPFPR.L	Palm t <i>al.</i> , 2005
2D	1	gi 159114369	medial body protein	66	100579/5.31	K.IDEYTLFMSR.S R.ITELEQQQR.T K.VNNYDQLADDKAR.L	Morrisom <i>et al.</i> , 2007
2D	2	gi 74267962 gi 1351907	ALB protein Albumin [<i>Bos taurus</i>] Serum albumin precursor (BSA)	75	71186/5.88	K.DAFLGSFLYEYSR.R K.HLVDEPQNLK.Q K.LGEYGFQNELIVR.Y R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	Keister, 1983
				76	71244/5.82	K.DAFLGSFLYEYSR.R R.RHPEYAVSVLLR.L K.LGEYGFQNALIVR.Y R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	
2D	4 e 6	gi 225632	casein alpha 51	84	24477/4.85	K.HQGLPQEVLENLLR.F R.FFVAPFPEVFGK.E R.YLGYLEQLLR.L	Keister, 1983
2D	8	gi 159116169	SALP-1	122	29866/5.37	R.YQHLYDAVNEQVLR.R R.AYHSVIASVKDEIK.S R.ETIVAGFSDLNR.A	Palme t <i>al.</i> , 2005
2D	9	gi 157885517 gi 118401008	Mp1p-like protein 10 [<i>Penicillium marneffeii</i>]	79	15571/4.91	-.VIEALLQFTNDIEKQSFQVLHK.D K.DVVVILQR.I R.IAVESQLDSR.D	Cao <i>et al.</i> , 1998 Eisen <i>et al.</i> , 2006
			Hypothetical protein TTHERM_00486130 [<i>Tetrahymena thermophila</i> SB210]	63	18838/7.03	R.IAVESQLDSRDVYSLEEGFK.A R.DVYSLEEGFK.A K.KTDIVGSDVCAELVK.D K.TDIVGSDVCAELVKDLK.D K.DAGRQISILVLGK.M R.QISILVLGK.M R.QISILVLGKMPPEEFFDIGK.K K.ASNKALQELQDTINDFSK.V K.ALQELQDTINDFSKV.- M.DKVEQPHVNANGHIYFYR.E K.VEQPHVNANGHIYFYR.E R.EYEHNGIFSNFYASPIALKEK.Q K.EKQWPTTEHYFQAQK.F K.FSGTEKEELIR.L K.EELIRLASTPSESFK.L R.LASTPSESFK.L R.LASTPSESFK.L K.DWESVKDEVMYEALK.A K.DEVMYEALK.A	

						K.DEVMYEALKAK.F K.YWADGGDGSCKNMLGILLMNL.R.N K.NMLGILLMNL.RNELK.A	
2D	10	gi 13604213	delta giardina	147	30969/5.59	R.VTDFHEDFKR.Q K.IAQEHDDLLESIR.Y K.TSAEESFGAFIGNLTNER.N R.ADREQSIDEYLR.D K.VLAGVVAELIATR.K	Palme <i>et al.</i> , 2005

Tabela com a identificação das proteínas de disco ventral isolado de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Os peptídeos dos géis uni e bidimensional foram hidrolizados por tripsina e submetidos a Q-TOF e MALDI-TOF-TOF, respectivamente, conforme descrito em Materiais e Métodos.

- 1- tipo do gel utilizado para a espectrometria de massa;
- 2- National Center for Biotechnology Information: numeração referente à proteína no banco de dados;
- 3- valor ideal acima de 35 para que a identificação seja considerada eficiente;
- 4- Peso molecular e ponto isoelétrico teóricos, fornecidos pelo banco de dados MASCOT;
- 5- peptídeos nos quais as análises foram fundamentadas.

VI – Discussão

1. Tratamento com Orizalina

1.1 Efeitos na proliferação de *Giardia lamblia*

Para identificar os efeitos *in vitro* do herbicida orizalina, examinamos a proliferação desses parasitas. Observamos alterações no crescimento de *Giardia* apenas com concentrações superiores a 10 μM , sendo que com 100 μM houve uma alta taxa de morte celular. Comparando com outro organismo anaeróbico, a *Entamoeba histolytica*, observamos que a orizalina foi mais efetiva para *Giardia*. A proliferação de *Giardia* foi inibida significativamente após tratamento com 50 μM de orizalina, enquanto o parasita *E. histolytica* apresentou inibição da divisão celular com o uso de 100 μM de orizalina (Makioka *et al.*, 2000). Contudo, a orizalina mostrou-se menos eficiente para *Giardia* se comparada com os efeitos encontrados em *Toxoplasma gondii* (Stokkermans *et al.*, 1996) e *Leishmania mexicana* (Chan *et al.*, 1991), principalmente se compararmos valores do IC_{50} , que para *Giardia* ficou acima de 70 μM , para *T. gondii* foi de aproximadamente 100 nM e para *L. mexicana* foi de 17,3 μM . Um sítio específico em α -tubulina foi encontrado para ligação de dinitroanilinos, como a orizalina, em *T. gondii*, *Plasmodium falciparum* e *L. major* (Mitra e Sept, 2006). Esse sítio específico pode explicar a pequena eficiência da orizalina quando aplicada em culturas de *Giardia*, comparando-se com outros parasitas. Assim, a orizalina pode afetar a proliferação de *G. lamblia* por interagir de uma forma específica e/ou diferente com a tubulina desse parasita.

1.2 Alterações na Ultraestrutura de *Giardia lamblia*

Analisamos os efeitos estruturais causados em *G. lamblia*, após o tratamento com orizalina, através de técnicas variadas de microscopia. Por microscopia eletrônica de transmissão, podemos observar uma forma anormal do trofozoíto e células que aparentemente não completaram a divisão celular. Por microscopia eletrônica de varredura, os trofozoítos apresentaram anormalidade na forma dos flagelos e também na divisão celular, já que “clusters” de células foram encontrados. Após a extração da membrana plasmática, e visualização por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução, a desorganização dos flagelos foi confirmada e a estrutura do disco ventral pode ser observada.

Nos resultados apresentados por microscopia eletrônica o disco aparece intacto. Acreditamos que a falta de ação da orizalina nos microtúbulos do disco ventral seja devido ao fato das microfitas, de alguma maneira ainda não elucidada, estarem impedindo o acesso da droga a um sítio específico da tubulina. Mitra e Sept, em 2006, demonstraram que os dinitroanilinos interagem com a tubulina de forma específica, e assim, as microfitas do disco podem estar impedindo essa ligação específica. Outra possibilidade é que as mesmas microfitas podem conferir uma estabilização adicional aos microtúbulos do disco, reforçando a associação entre os monômeros de tubulina. Contudo, com o auxílio de trabalhos anteriores (Campanati *et al.*, 2003), não acreditamos que modificações pós-traducionais, como a acetilação, seriam responsáveis pela não-ação da orizalina no disco. Isso porque as modificações estão presentes também em outras estruturas do citoesqueleto, como os flagelos, que após o tratamento com orizalina aparecem afetados drasticamente.

Trofozoítos tratados com orizalina também foram analisados por imunofluorescência. A alteração no corpo mediano merece destaque. Sabendo que a orizalina é um agente desestabilizador de microtúbulos, era de se esperar que a tubulina, em sua forma polimérica, fosse desaparecendo

com o tempo. No entanto, observamos que o corpo mediano adquire uma forma alongada. O corpo mediano é um conjunto de microtúbulos estáveis e instáveis, disposto longitudinalmente na região dorsal do parasita. Acreditamos que a orizalina esteja afetando apenas os microtúbulos mais estáveis do corpo mediano, enquanto os instáveis continuam crescendo. Foi demonstrado que em *Toxoplasma gondii* a orizalina, usada em determinadas concentrações, age de maneira diferente nessas duas formas de microtúbulos – estáveis e instáveis (Stokkermans *et al.*, 1996; Morrissette e Sibley, 2002b). Os microtúbulos do fuso (altamente dinâmicos) não foram afetados, enquanto os microtúbulos subpeliculares de *T. gondii*, (considerados muito estáveis) foram.

1.3 Síntese de Tubulina

Outra possibilidade para a ação da orizalina é baseada em estudos com *Tetrahymena thermophila*, onde os níveis de RNAm e a síntese de tubulina foram acompanhados após o tratamento com orizalina (Stargell *et al.*, 1992). Em células de mamíferos, após o tratamento com drogas despolimerizadoras de microtúbulos, há um aumento no número de tubulina livre no citoplasma. Contudo, graças a um mecanismo auto-regulatório dos níveis de RNAm, após o tratamento com essas drogas, a síntese de tubulina diminui. Em *Tetrahymena* foi observado o contrário. Com a utilização da orizalina, ocorreu um aumento na concentração de RNAm e também na síntese de tubulina. De acordo com nossos resultados da expressão de tubulina, não observamos aumento após o tratamento com 50 e 100 μM de orizalina. A expressão da tubulina não é alterada. Contudo, a desorganização dos microtúbulos foi evidenciada pelas análises de microscopia óptica e eletrônica, observando um aumento no corpo mediano. Neste caso, como não evidenciamos diferenças na quantidade de tubulina por Western blotting, a orizalina pode estar participando da desorganização estrutural dos microtúbulos estáveis do corpo mediano, mas não estaria influenciando a produção de

tubulina na célula. Contudo, é necessário realizar uma análise dos níveis de RNAm para confirmarmos o mecanismo de controle da produção de tubulina após o tratamento com orizalina.

2. Isolamento do Disco ventral

O trabalho realizado por Holberton e Ward (1981) foi pioneiro no isolamento do citoesqueleto de *Giardia lamblia*. Palm e colaboradores (2005) com o intuito de observar as mudanças ocorridas no disco ventral durante o processo de encistamento, utilizaram o protocolo sugerido por Holberton e Ward, para extração do disco. Contudo, Palm e colaboradores modificaram o período de agitação em vortex (com alternância entre 2 minutos de agitação e 2 minutos de descanso no gelo, repetindo este procedimento três vezes) e também a velocidade e o tempo de centrifugação (12000 g por 15 minutos).

A partir de um protocolo desenvolvido para o isolamento do disco ventral, identificamos as principais estruturas do disco de *Giardia*, como os microtúbulos e as microfitas, por microscopia eletrônica. As imagens obtidas foram semelhantes às encontradas por Holberton e Ward (1981). Contudo, comprovamos a pureza do processo de isolamento. Não encontramos outras organelas como os núcleos, vesículas periféricas ou retículo endoplasmático. Utilizando metodologia desenvolvida por Rocha e colaboradores, obtivemos imagens por microscopia de força atômica (AFM) que contribuíram para o melhor entendimento da estrutura do disco, principalmente quanto à disposição dos microtúbulos que o constituem, sendo possível observar os corpos basais localizados na “zona nua” do disco. Não encontramos, até o momento, por microscopia de força atômica, uma nova estrutura associada ao citoesqueleto. Em recente trabalho do nosso grupo obtivemos imagens semelhantes, através da microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FESEM), identificando além dos corpos basais e da “zona nua”, outras estruturas como o bastão denso e as placas marginais, associadas aos flagelos anteriores, localizadas acima do disco ventral (Sant’Anna

et al., 2005). A não visualização por AFM das placas marginais pode estar relacionada ao uso do detergente em maior concentração. No entanto, acreditamos que após algumas adaptações na metodologia de preparo do material e no microscópio de força atômica, será possível obter informações estruturais mais detalhadas com essa modalidade de microscopia.

2.1 Perfil protéico do Disco ventral

A análise protéica do citoesqueleto de *Giardia* foi realizada anteriormente (Holberton e Ward, 1981; Crossley e Holberton, 1983b; Palm *et al.*, 2005). Contudo, os trabalhos apresentados utilizaram protocolos para o isolamento não do disco ventral, mas de todo o citoesqueleto. Em 1981, Holberton e Ward encontraram em seu gel unidimensional apenas duas bandas majoritárias, correspondendo a proteínas com peso molecular aparente de 52,5 e 30 KDa. Neste trabalho, os pesquisadores afirmaram que a proteína de peso molecular de aproximadamente 50 KDa poderia ser a tubulina, já que compararam com o perfil de corrida da tubulina purificada de cérebro de porcos (Holberton e Ward, 1981). Já em 1983, Crossley e Holberton, após isolamento do citoesqueleto de *G. Lambli*a, identificaram, através do gel unidimensional, 20 bandas, sendo que dentre estas já se conhecia as isoformas α e β da tubulina (Crossley e Holberton, 1983b). Ainda em 1981, não se conhecia a giardina como proteína característica de *Giardia*. Foi no trabalho de 1983 que a proteína encontrada com peso molecular de aproximadamente 30 KDa foi denominada de giardina.

Palm e colaboradores, em 2005, reproduzindo os protocolos de isolamento do citoesqueleto de Holberton e Ward (1981), identificaram 12 *spots*, através da eletroforese bidimensional. Posteriormente, foi realizada, a partir deste gel, a análise proteômica por espectrometria de massa, sendo identificada a família da giardina (Alpha-1, Beta, Delta e Gamma) e duas isoformas de tubulina (Alpha-2 tubulina e Beta-tubulina). Além destas foi identificada uma nova proteína, a

SALP-1, homóloga às proteínas que participam da agregação de fibras estriadas (Palm *et al.*, 2005). Apesar da identificação de famílias de proteínas majoritárias de *Giardia*, o protocolo utilizado para isolamento de todo citoesqueleto pode “mascarar” a presença de proteínas minoritárias presentes apenas no disco ventral. Assim, para caracterizar e obter maior cobertura de proteínas identificadas apenas do disco, realizamos análise do perfil protéico obtido a partir dos géis uni e bidimensional.

O perfil protéico de frações de disco ventral foi obtido após eletroforese uni e bi dimensional em gel de poliacrilamida. A análise do gel unidimensional indicou um grupo de 4 proteínas majoritárias com peso molecular entre 25 e 58 KDa. Já a análise do gel bidimensional indicou 18 *spots*, um número maior, se comparado ao encontrado por Palm e colaboradores em 2005. Também o padrão de distribuição dos *spots* no gel bidimensional foi diferente. No trabalho de Palm e colaboradores (2005) não foram encontradas proteínas de massa molecular abaixo de 24 KDa, como identificado nos nossos resultados. Assim, acreditamos que esses *spots* representam a fração somente de discos isolados e não de todo citoesqueleto. Por isso a diferença encontrada no número e no padrão de distribuição.

Após análise, por espectrometria de massas, dos géis uni e bidimensionais, foram identificadas 13 proteínas, das quais 9 possuem função e localização conhecidas. Várias destas proteínas já foram descritas em disco ventral, como as da família da tubulina (alpha e beta) e da giardina (gama e delta). Contudo, outras isoformas já descritas para a família das giardinas, como a beta e alpha-giardinas não foram encontradas (Palm *et al.*, 2005). Esta ausência de isoformas de giardina nas nossas análises pode ser explicada pela falta de *hits* relevantes de alguns *spots*, não sendo possível identificá-los. Não podemos deixar de levar em consideração que a ausência dessas isoformas de giardina seja devido à baixa quantidade dessa proteína no preparado ou que a preparação da fração de discos leve à dissociação dessas proteínas da estrutura.

A partir do gel 2D ainda foram identificadas duas proteínas localizadas no mesmo *spot* (9). Essas proteínas referem-se a Mp1p, proteína encontrada no fungo *Penicillium marneffe*, e a proteína hipotética TTHERM, encontrada no ciliado *Tetrahymena thermophila*. De acordo com Cao e colaboradores a proteína Mp1p é encontrada em parede celular de fungos e possui muitos sítios específicos. Dentre esses sítios, um apresenta uma seqüência para adesão (Cao *et al.*, 1998). A proteína hipotética TTHERM, de acordo com Eisen e colaboradores, é homóloga de tubulina (Eisen *et al.*, 2006). Nesta publicação do genoma de *T. thermophila*, os autores acreditam que os genes que codificam para essa proteína estão relacionados com a formação do sistema microtubular desse ciliado. Portanto, as duas proteínas encontradas, mesmo não estando anotadas no genoma de *Giardia*, parecem ter relação com os processos relacionados ao disco ventral.

A análise proteômica tem sido usada com sucesso em protozoários como *Entamoeba histolytica* (Okada e Nozaki, 2006) e *Trypanosoma cruzi* (Paba *et al.*, 2004). Estes trabalhos fomentaram valiosas informações sobre a localização de proteínas, confirmando a presença de umas e detectando novas proteínas residentes nesses parasitos. No presente trabalho, ao iniciarmos a proteômica de uma estrutura como o disco ventral, relacionada à adesão de *Giardia lamblia* ao epitélio intestinal, e conseqüentemente à manutenção da infecção, podemos identificar proteínas marcadoras para o disco ventral, que possibilite, por exemplo, o estudo da formação desta estrutura, assim como suas modificações durante o processo de encistamento. Também, esses resultados poderão explicar a dinâmica do disco ventral durante a adesão, sendo possível identificar proteínas que estejam diretamente relacionadas a este processo.

VII -CONCLUSÕES

- A droga herbicida orizalina mostrou-se eficiente para o estudo da heterogeneidade microtubular de *Giardia lamblia*;
- A orizalina alterou a organização dos microtúbulos do corpo mediano e dos pares de flagelos, mas não alterou o disco ventral, uma estrutura estável;
- Após o tratamento com orizalina, não há alteração na expressão de tubulina pela célula;
- O protocolo de isolamento de disco ventral foi desenvolvido durante esse projeto. A pureza das frações obtidas por fracionamento foi confirmada, através do padrão do extrato protéico obtido;
- Foram identificadas 13 proteínas no disco ventral por espectrometria de massas. Destas proteínas, 9 apresentam função e localização conhecidas.

VIII - REFERÊNCIAS

- ADAM RD. 2000. The *Giardia lamblia* genome. **Int J Parasitol** 30: 475-484.
- ADAM RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev** 14: 447-475.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K & WATSON JD. **Molecular Biology of the Cell** 4 ed., Garland, p. 577-599, 2002.
- BENBOW JW, BERNBERG EL, KORDA A, MEAD JR. 1998. Synthesis and evaluation of dinitroanilines for treatment of cryptosporidiosis. **Antimicrob Agents Chemother.** 42: 339-343.
- BENCHIMOL M, PIVA B, CAMPANATI L, DE SOUZA W. 2004. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field scanning elétron microscopy – new insights. **J Struct Biol** 147: 102-115.
- BENCHIMOL M. 2004a. Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. **Biol Cell** 96: 291-293.
- BENCHIMOL M. 2005. The nuclei of *Giardia lamblia* – new ultrastructural observations. **Arch Microbiol** 183:160-168.
- BENDESKY A, MENÉNDEZ D, OSTROSKY-WEGMAN P. 2002. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res.** 511: 133-144.
- BERDYEEVA T, WOODWORTH CD, SOKOLOV I. 2005. Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope . **Ultramicroscopy** 102: 189–198.
- BOGGILD A, SUNDERMANN CA, ESTRIDGE BH. 2002. Post- translational glutamylation and tyrosination in tubulin of tritrichomonad and the diplomonad *Giardia intestinalis*. **Parasitol Res** 88: 58-62.

- CAMPANATI L, HOLLOSCHI A, TROSTER H, SPRING H, DE SOUZA W, MONTEIRO-LEAL LH. 2002. Video-Microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoan *Giardia lamblia*. **Cell Motil Cytoskel**. 51: 213-224.
- CAMPANATI L, TROSTER H, MONTEIRO-LEAL LH, SPRING H, TRENDELENBURG MF, DE SOUZA W. 2003. Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. **Histochem Cell Biol**. 119: 323-331.
- CAO L, CHAN CM, LEE C, WONG SS, YUEN KY. 1998. MP1 encodes an abundant and highly antigenic cell wall mannoprotein in the pathogenic fungus *Penicillium marneffeii*. **Infect Immun**. 66: 966-973.
- CAVALIER-SMITH, T. 2002. The phagotrophic origin of eucaryotes and phylogenetic classification of protozoa. **Int Syst Evol Microbiol** 52: 297-354.
- CHAN MM-Y, GROGL M, CHEN CC, BIENEN EJ, FONG D. 1993. Herbicides to curb human parasitic infections: in vitro and in vivo effects of trifluralin on the trypanosomatid protozoans. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 5657-5661.
- CHAN MM-Y, TREMER RE, FONG D 1991. Effect of the antimicrotubule drug oryzalin on growth and differentiation of the parasitoid protozoan *Leishmania mexicana*. **Differentiation** 46: 15-21.
- CHAVEZ B, CEDILLO-RIVERA R, MARTINEZ-PALOMO A., 1992. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. **J Protozol** 39:510-515.
- CHIN A.C.2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3- dependent manner. **Infect. Immun**. 70: 3673-3680.
- CIDADE GAG, COSTA LT, WEISSMÜLLER G, DA SILVA NETO AJ, ROBERTY NC, DE MORAES MB, PRAZERES GM, HILL CE, RIBEIRO SJ, DE SOUZA GG, DA SILVA PINTO TEIXEIRA L, DA COSTA MONÇORES M, BISCH PM. 2003. Atomic Force Microscopy as a Tool for Biomedical and Biotechnological Studies. **Artificial Organs** 27: 447-451.
- CLARK JT, HOLBERTON DV. 1988. Triton-labile antigens in flagella isolated from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res**. 74: 415-423.
- CORBETT JR, WRIGHT K, BAILLIE AC. 1984. The biochemical mode of action of pesticides, 2nd edn. Academic Press, London.

- CORRÊA G, BENCHIMOL M. 2005. *Giardia lamblia* behavior under cytochalasins treatment. **Parasitol Res.** 98 :250-256.
- CROSSLEY R, HOLBERTON DV. 1983a. Selective extraction with sarkosyl and polymerization *in vitro* of cytoskeleton proteins from *Giardia*. **J Cell Sci.** 62: 419-438.
- CROSSLEY R, HOLBERTON DV. 1983b. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **J Cell Sci** 59: 81-103.
- CROSSLEY R, MARSHALL J, CLARK JT, HOLBERTON DV. 1986. Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to alpha-tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. **J Cell Sci** 80: 233-252.
- DAS S, GILLIN FD. 1996. *Giardia lamblia*: Increased UDP-*N*-acetyl-D-glucosamine and *N*-Acetyl-D-galactosamine Transferase Activities during Encystation. **Exp Parasitology** 83: 19-29.
- DAVIDS BJ, WILLIAMS S, LAUWAET T, PALANCA T, GILLIN FD. 2008. *Giardia lamblia* aurora kinase: A regulator of mitosis in a binucleate parasite. **Int J Parasitol.** 38:353–369.
- EDLIND TD, HANG TL, CHAKRABORTY PR. 1990. Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. **J Infect Dis.** 162: 1408-1411.
- EISEN JA, COYNE RS, WU M, WU D, THIAGARAJAN M, WORTMAN JR, BADGER JH, REN Q, AMEDEO P, JONES KM, TALLON LJ, DELCHER AL, SALZBERG SL, SILVA JC, HAAS BJ, MAJOROS WH, FARZAD M, CARLTON JM, SMITH RK, GARG J, PEARLMAN R, KARRER KM, SUN L, MANNING G, ELDE NC, TURKEWITZ AP, ASAI DJ, WILKES DE, WANG Y, CAI H, COLLINS K, STEWART B. A, LEE SR, WILAMOWSKA K, WEINBERG Z, RUZZO WL, WLOGA D, GAERTIG J, FRANKEL J, TSAO CHE-CHIA, GOROVSKY MA, KEELING PJ, WALLER RF, PATRON NJ, CHERRY J. M, STOVER NA, KRIEGER CJ, TORO CD, RYDER HF, WILLIAMSON SC, BARBEAU RA, HAMILTON EP, ORIAS E. 2006. Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. **PLoS Biol.** 4: e286.
- ELMENDORF HG, DAWSON SC, MCCAFFERY M. 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **Int J Parasitol** 33 : 3-28.

- ERLANDSEN SL, CHASE DG.1974. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal micro-organisms. **Am J Clin Nutr.** 27: 1277-1286.
- ERLANDSEN SL, RUSSO AP, TURNER JN. 2004. Evidence for adhesive activity of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. **J Eukaryot Microbiol.** 51:73-80.
- FARTHING M.J. 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 24: 79-88.
- FARTHING MJ, PEREIRA ME, KEUSCH GT. 1986. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. **Infect Immun.** 51: 661-667.
- FAUBERT G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. **Clin Microbiol Rev.** 13: 35-54.
- FEELY DE, ERLANDSEN SL, CHASE DG, 1990. The biology of *Giardia*. In: Human parasitic diseases, vol. 3. Giardiasis. Meyer EA (ed.).Elsevier. pp11-50.
- FEELY DE, SCHOLLMAYER JV, ERLANDSEN SL. 1982. *Giardia* spp: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. **Exp Parasitol.** 53: 145-154.
- FENNELL BJ, NAUGHTON JA, DEMPSEY E, BELL A. 2006. Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on *Plasmodium falciparum*: tubulin as a specific antimalarial target. **Mol Biochem Parasitol.** 145: 226-238.
- FILICE FP. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. **University of California Publications in Zoology.** 57:53-145.
- FRIEND DS. 1966. The fine structure of *Giardia muris*. **J Cell Biol.** 29: 317-332.
- GILLIN FD, REINER DS. 1982 Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature and ionic composition. **Mol Cell Biol.** 2: 369-377.
- GILLIN FD, REINER DS, MCCAFFERY JM. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **Annu Rev Microbiol.** 50: 679-705.

- GORDON M.B., HOWARD L., COMPTON D.A., 2001. Chromosome movement in mitosis requires microtubules anchorage at spindle poles. **J Cell Biol** 152: 425-434.
- HOLBERTON DV. 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. **J Cell Sci.** 13: 11-41.
- HOLBERTON DV. 1974. Attachment of *Giardia* – a hydrodynamic model based on flagellar activity. **J Exp Biol.** 60: 207-221.
- HOLBERTON DV. 1981. Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. **J Cell Sci.** 47: 167-185.
- HOLBERTON DV, WARD AP. 1981. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. **J Cell Sci.** 47: 139-166.
- HUGDAHL JD, MOREJOHN LC. 1993. Rapid and Reversible High-Affinity Binding of the Dinitroaniline Herbicide Oryzalin to Tubulin from *Zea mays*. **Plant Physiol.** 102: 725-740.
- KABNICK KS, PEATTIE DA. 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. **J Cell Sci** 95: 353-360.
- KEISTER DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 77: 487-488.
- KULDA, J E NOHÝNKOVÁ, E. 1995. *Giardia* in humans and animals, second ed. (In: Kreier, JP), vo. 10, p. 225-422. Academic Press, San Diego.
- LANFREDI- RANGEL A, ATTIAS M, DE CARVALHO TM, KATTENBACH WM, DE SOUZA W. 1998. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and lysosomes. **J Struct Biol.** 123: 225-235.
- LOWRY OH, ROSERROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 193:265-275.

- MAKIOKA A, KAMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S AND TAKEUCHI T. 2000. Effect of the antitubulin drug oryzalin on the encystations of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res* 86: 625-629.
- MARIANTE RM, VANCINI RG, MELO AL, BENCHIMOL M. 2005. *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. **Exp Parasitol**. 110: 62-72.
- MCARTHUR AG, MORRISON HG, NIXON JE, PASSAMANECK NQ, KIM U, HINKLE G, CROCKER MK, HOLDER ME, FARR R, REICH CI, OLSEN GE, ALEY SB, ADAM RD, GILLIN FD, SOGIN ML. 2000. The *Giardia* project database. **FEMS Microbiol Lett**. 189 :271-273.
- MEYER EA. 1992. *Giardia* as an organism. In: *Giardia*: from molecules to disease. Thompson, Reynoldson and Lymbery (eds). p5.
- MITRA A, SEPT D. 2006. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid α -tubulin. **J Med Chem**. 49: 5226-5231.
- MORGAN RO, FERNANDEZ MP. 1995. Molecular phylogeny of annexin and identifications of primitive homolog in *Giardia lamblia*. **Mol Biol Evol**. 12: 967-979.
- MORRISON HG, MCARTHUR AG, GILLIN FD, ALEY SB, ADAM RD, OLSEN GJ, BEST AA, CANDE WZ, CHEN F, CIPRIANO MJ, DAVIDS BJ, DAWSON SC, ELMENDORF HG, HEHL AB, HOLDER ME, HUSE SM, KIM UU, LASEK-NESELQUIST E, MANNING G, ANURANJINI N, NIXON JEJ, PALM D, PASSAMANECK NE, PRABHU A, REICH CI, REINER DS, SAMUELSON J, SVARD SG, SOGIN ML. 2007 . Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. **Science** 317. 5846: 1921 - 1926
- MORRISSETTE NS, SIBLEY LD. 2002a. Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**. 115:1017-1025.
- MORRISSETTE NS, SIBLEY LD. 2002b. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiol Mol Biol Rev**. 66: 21-38.
- MUELLER JC, JONES AL, BRANDBORG LL. 1974. Scanning electron microscopy observations in human giardiasis. In: Johari, O. (Ed). *Scanning Electron Microscopy*. Chicago.

- NASH TE. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. **Mol. Microbiol.** 45: 585-590.
- NARCISI EM, PAULIN JJ, FECHHEIMER M. 1994. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. **J Parasitol.** 80:468-473.
- OKADA M, NOZAKI T. 2006. New Insights into Molecular Mechanisms of Phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by Proteomic Analysis. **Arch of Med Res** 37: 244–252.
- PABA J, RICART CA, FONTES W, SANTANA JM, TEIXEIRA AR, MARCHESE J, WILLIAMSON B, HUNT T, KARGER BL, SOUSA MV. 2004. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. **J Proteome Res.** 3: 517-524.
- PALM D, WEILAND M, MCARTHUR AG, WINIECKA-KRUSNELL J, CIPRIANO MJ, BIRKELAND SR, PACOCHA SE, DAVIDS B, GILLIN F, LINDER E, SVARD S. 2005. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. **Mol Biochem Parasitol** 141: 199-207.
- PARKA SJ, SOPER OF 1977. The physiology and mode of action of the dinitroaniline herbicides. **Weed Sci** 25: 79-87.
- PEATIE DA, ALONSO RA, HEIN A, CAULFIELD JP. 1989. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced proteins sequence of alpha giardin. **J Cell Biol.** 109: 2323-2335.
- PIVA B, BENCHIMOL M. 2004. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. **Biol Cell** 96: 735-746.
- ROCHA GM, MIRANDA K, WEISSMÜLLER G, BISCH PM, DE SOUZA W. 2007. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* revisited by atomic force microscopy. **Microsc Res Tech.** 71:133-139.
- ROXSTROM-LINDQUIST K, PALM D, REINER D, RINGQVIST E, SVARD SG. 2006. *Giardia* immunity- an update. **Trends Parasitol.** 22 :26-31.

- SAGOLLA MS, DAWSON SC, MANCUSO JJ AND CANDE WZ. 2006. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. **J Cell Science** 119: 4889-4900.
- SANT'ANNA C, CAMPANATI L, GADELHA C, LOURENÇO DC, LABATI-TERRA L, BITTENCOURT SILVESTRE J, BENCHIMOL M, LEAL CUNHA N, DE SOUZA W. 2005. Improvement on the visualization of cytoskeleton structures of protozoan parasites using high resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). **Histochem Cell Biol** 124: 87 – 95.
- STEFANIC S, PALM D, SVÄRD SG, HEHL AB. 2006. Organelle Proteomics Reveals Cargo Maturation Mechanisms Associated with Golgi-like Encystation Vesicles in the Early-diverged Protozoan *Giardia lamblia*. **J Biol Chem**. 11: 7595-7604.
- SCHLIWA M., AND VAN BLERKOM J. 1981. Structural interaction of cytoskeleton components. **J Cell Biol** 90: 222-235
- SOLTYS BJ, GUPTA RS. 1994. Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated α -tubulin. **J Euk Microbiol**. 41: 625-632.
- SOUSA MC, GONÇALVES CA, BAIROS VA, POIARES-DA- SILVA J. 2001. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. **Clin Diagn Lab Immunol**. 8: 258-265.
- STARGELL LA, HERUTH DP, GAERTIG J, GOROVSKY MA. 1992. Drugs affecting microtubule dynamics increase alpha-tubulin mRNA accumulation via transcription in *Tetrahymena thermophila*. **Mol Cell Biol**. 12: 1443-1450.
- STEARNS T, KIRSCHNER M. 1994. In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. **Cell** 76: 623-637.
- STOKKERMANS TJW, SCHWARTZMAN JD, KEENAN K, MORRISSETTE NS, TILNEY LG, ROOS DS 1996. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. **Exp Parasitol** 84:355-370.
- SUN CHIN-HUNG, SU LI-HSIN, GILLIN FD 2006. Novel plant-GARP-like transcription factors in *Giardia lamblia*. **Molec Biochem Parasitol** 146:45-57.

- TEOH DA. 2000. *Giardia lamblia* rearranges F-actin and α -actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance. **J Parasitol.** 86:800-8006.
- TOVAR J, LEON-AVILA G, SÁNCHEZ LB, SUTAK R, TACHEZY J, GIEZEN M, HERNÁNDEZ M, MULLER M, LUCOCQ JM. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron- Sulphur protein maturation. **Nature** 426: 712-716.
- TRAUB- CSEKO YM, RAMALHO-ORTIGAO JM, DANTAS AP, DE CASTRO SL, BARBOSA HS, DOWNING KH. 2001. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol.** 17: 136-141.
- VENKATESAN P. 1998. **Albendazole J Antimicrob Chemother.** 41: 145-147.
- WEBER K, SCHNEIDER A, WESSERMANN S, MULLER N, PLESSMANN U. 1997. Posttranslational modifications of α and β -tubulin in *Giardia lamblia*, an ancient eukaryote. **FEBS Lett.** 419: 87-91.
- WEILAND ME, PALM JE, GRIFFITHS WJ, MCCAFFERY JM, SVARD SG. 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. **Int J Parasitol.** 33: 1341-1351.
- YU LZ, BIRKY CW JR, ADAM RD. 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of genome and partitioned equationally at cytokinesis. **Eukaryot Cell.** 1: 191-199.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)