Thaís Batista de Carvalho

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia duodenalis*

Orientadora: Profª Drª Semíramis Guimarães Ferraz Viana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, para a obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

Botucatu/SP
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Carvalho, Thaís Batista de.
Identificação e caracterização dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *Giardia duodenalis* / Thaís Batista de Carvalho - Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.
Orientador: Profª. Drª. Semíramis Guimarães Ferraz Viana.
Assunto CAPES: 40100006

1. Medicina tropical.

CDD 616.9

Palavras chave: Atividade proteolítica; Cepas axênicas; *Giardia duodenalis*; Produtos de excreção/secreção; Trofozoítos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1

2. OBJETIVOS.....14

3. MATERIAL E MÉTODOS.....16

3.1. Cepas de *Giardia duodenalis*.....17

3.1.1. Portland 1 (P-1).....17

3.1.2 BTU-11 (91/JFC).....17

3.2. Manutenção das cepas de *G. duodenalis*.....18

3.3. Obtenção dos produtos de excreção/secreção (PE/S).....18

3.4. Determinação da concentração de proteínas dos produtos de excreção/secreção.....19

3.5. Análise do perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*.....20

3.5.1. Eletroforese das proteínas dos produtos de excreção/secreção.....20

3.5.2. Coloração dos géis pela prata.....21

3.5.3. Determinação dos pesos moleculares.....22

3.6. Análise da atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis* sobre substratos protéicos.....22

3.6.1. Atividade das proteases em géis de SDS-PAGE copolimerizados com gelatina e colágeno.....22

3.6.2. Degradação da hemoglobina.....23

3.7. Efeito de inibidores sobre a atividade das proteases.....24

Tabela 1. Inibidores sintéticos de proteases.....24

4. RESULTADOS.....26

4.1. Análise do perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*.....27

Figura 1.....28

4.2. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*.....29

4.2.1. Análise do perfil de hidrólise em géis SDS-PAGE copolimerizados com substratos protéicos.....29

4.2.1.1. Zimograma em géis SDS-PAGE-Gelatina.....29

4.2.1.2. Zimograma em géis SDS-PAGE-Colágeno.....30

Figuras 2 e 3.....31

4.3. Perfil de degradação da hemoglobina.....32

4.4. Efeito de inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*.....32

Figura 4.....33

4.4.1. Perfis de hidrólise em géis SDS-PAGE-Gelatina tratados com inibidores.....34

Figura 5.....35

Figura 6.....36

Figura 7.....37

4.4.2. Perfis de hidrólise em géis SDS-PAGE-Colágeno tratados com inibidores.....38

Figura 8.....39

Figura 9.....40

4.4.3. Perfis de hidrólise da hemoglobina após tratamento dos PE/S com inibidores.....41

Figura 10.....42

Figura 11.....43

5. DISCUSSÃO.....44

6. CONCLUSÕES.....60

7. REFERÊNCIAS.....62

8. RESUMO.....73

9. ABSTRACT.....76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Giardia* inclui protozoários flagelados que podem parasitar o intestino delgado de várias espécies de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Atualmente, *Giardia* é considerado um dos 10 principais parasitas que infectam o homem, principalmente, nos países em desenvolvimento, onde é uma das causas mais comuns de diarréia infecciosa[1].

Esse protozoário foi observado pela primeira vez em 1681 por Anton van Leeuwenhoek, a partir da análise das suas próprias fezes, porém foi Lambl, em 1859, quem o descreveu mais detalhadamente. Nessa ocasião, Lambl por ter acreditado que o protozoário pertencia ao gênero *Cercomonas*, denominou-o *Cercomonas intestinalis*[1]. O gênero *Giardia* foi criado por KUNSTLER[2] ao observar um flagelado presente no intestino de girinos de anfíbios anuros. Após a criação do gênero, vários nomes foram atribuídos às espécies, entre eles, *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia* e *Giardia enterica.* Vale destacar que, as denominações *G. lamblia*, *G. duodenalis* e *G. intestinalis* têm sido empregadas como sinonímia, particularmente para isolados de origem humana.

Apesar de ter sido observado pela primeira vez em 1681, *Giardia* apenas começou a despertar maior interesse dos pesquisadores em 1932, quando o parasitologista Charles Stiles suspeitou de que havia uma relação entre a infecção pelo protozoário e a ocorrência de casos de diarréia[3]. A partir de então, tem sido um dos parasitas mais investigados, entretanto, ainda persistem grandes questões que não foram adequadamente elucidadas, em

especial, no que diz respeito à taxonomia, patogenicidade e ao potencial zoonótico.

Ainda hoje, a taxonomia desse protozoário é controversa e a determinação das espécies tem se baseado em critérios como hospedeiro de origem e características morfológicas. Entretanto, diferentes autores acreditam que considerar o hospedeiro não constitui um critério válido, uma vez que, pela análise do DNA, espécies de *Giardia* de diferentes hospedeiros apresentam-se idênticas, enquanto que aquelas de um mesmo hospedeiro podem ser marcantemente diferentes[4]. Diante disso, a classificação proposta por FILICE[5] em 1952 tem sido a mais aceita, sendo que, de acordo com este sistema, o gênero *Giardia* é dividido em três espécies: *G. duodenalis* que infecta vários mamíferos, inclusive o homem, aves e répteis, *G. muris* que infecta roedores, aves e répteis e *G. agilis* que infecta anfíbios. Além dessas três espécies, duas espécies encontradas em aves foram propostas: *G. psittaci*[6] e *G. ardeae*[7] descritas em periquitos e garças azuis, respectivamente. Uma sexta espécie, *G. microti*, encontrada em roedores conhecidos como camundongo-do-campo e rato-almiscarado, foi proposta com base na morfologia do cisto[8] e na análise da seqüência da subunidade menor do RNA ribossômico[9].

Estudos moleculares recentes têm revelado que *G. duodenalis* é um complexo que inclui isolados morfologicamente indistingüíveis, porém geneticamente distintos. Até o momento, isolados de *Giardia* obtidos do homem e de outras espécies de mamíferos, foram incluídos em oito grupos genéticos principais, denominados “assemblages”. As investigações epidemiológicas revelam que o homem pode ser infectado pelos genótipos

identificados como “assemblages” A e B, que reúnem isolados considerados potencialmente zoonóticos, pois infectam também os cães[10].

No que se refere à biologia de *Giardia*, o ciclo de vida é relativamente simples, visto que o parasita apresenta apenas duas formas evolutivas distintas, o trofozoíto e o cisto. Durante o ciclo biológico, os trofozoítos aderidos à mucosa intestinal multiplicam-se por divisão binária e passam por um processo de encistamento formando assim, os cistos, os quais são eliminados com as fezes do hospedeiro. Os cistos são as formas infectantes para o homem e para os animais, sendo que a transmissão ocorre por via fecal-oral, seja, indiretamente, pela ingestão de água e alimentos contaminados, ou, diretamente, de pessoa a pessoa por meio de mãos contaminadas e a partir do contato com animais infectados com *Giardia*. Nos países em desenvolvimento, onde faltam condições básicas de saneamento e tratamento de água eficiente, a água consiste em importante veículo para a transmissão de *Giardia*, seja pela ingestão direta ou indiretamente pelo consumo de alimentos ou bebidas preparados com água contaminada; além da contaminação acidental do ser humano, durante atividades recreacionais ou profissionais[11].

A infecção por *Giardia* apresenta ampla distribuição mundial, podendo ocorrer em populações residentes em áreas desenvolvidas e em desenvolvimento. Entretanto, as maiores prevalências são observadas em áreas onde as condições sanitárias e sócio-econômicas da população são precárias. Segundo a Organização Mundial da Saúde (1996)[12], estima-se que haja aproximadamente 200 milhões de pessoas entre a Ásia, África e América Latina com giardíase sintomática, sendo que 500 mil novos casos são

Excluído: ¶

registrados a cada ano. Entre os indivíduos residentes em países desenvolvidos, como por exemplo, os Estados Unidos, Canadá, Reino Unido e Austrália, *Giardia* é o principal parasita encontrado na população. Nessas áreas, além das altas prevalências constatadas em grupos específicos, como por exemplo, em viajantes e homens homossexuais, a infecção por *Giardia* é a causa mais freqüente de surtos epidêmicos de diarréia associados à água para consumo[13].

Quanto à sintomatologia, a infecção por *Giardia* apresenta um espectro clínico diverso, entretanto a maioria dos indivíduos é assintomática. Nas infecções sintomáticas, a manifestação clínica mais freqüente é a diarréia que pode ser aguda ou crônica, mas com freqüência, a infecção é resolvida espontaneamente e os sintomas desaparecem em algumas semanas[14]. Maior impacto clínico da infecção por *Giardia* tem sido observado em indivíduos malnutridos, imunocomprometidos e em crianças. Nessas últimas, as complicações decorrentes da giardíase, como a diarréia persistente e a má absorção intestinal, podem comprometer o desenvolvimento físico e mental[15].

Apesar dos vários estudos, pouco é conhecido sobre a patofisiologia da diarréia e da má absorção intestinal associadas à infecção, sendo que os eventos responsáveis por alterações do epitélio intestinal ainda não foram completamente elucidados[16]. Ao que tudo indica, os mecanismos etiopatogênicos na giardíase são multifatoriais, podendo ser determinados por fatores relacionados ao parasita (mecânicos, proteolíticos, imunológicos) e ao hospedeiro (dieta, microflora intestinal e estados nutricional e imunológico)[11].

Dessa forma, a interação estabelecida entre o parasita e o hospedeiro envolve mecanismos que podem participar diretamente da patogênese da giardíase.

Excluído:

Diferentemente do que ocorre em outras infecções parasitárias, *Giardia* pode determinar alterações morfológicas e fisiológicas do epitélio intestinal sem que haja invasão tissular e celular. A colonização do intestino pelo parasita pode alterar a arquitetura da mucosa intestinal, especialmente, no que diz respeito à organização das microvilosidades. Análises histopatológicas de biópsias intestinais obtidas de animais inoculados experimentalmente e de indivíduos infectados têm revelado alterações que podem variar desde o achatamento até a atrofia das microvilosidades[17,18]. A grande maioria dos pesquisadores concorda que as alterações estruturais da mucosa intestinal, possivelmente em combinação com outros mecanismos patológicos, sejam uma das causas dos distúrbios intestinais associados à giardíase.

Atualmente, estudos bioquímicos e de biologia molecular têm possibilitado a identificação de moléculas do parasita envolvidas na relação parasita-hospedeiro e que participam da patogênese da giardíase. Em estudos recentes sobre a patofisiologia da giardíase, chama a atenção dos pesquisadores o fato de que a atividade de produtos do parasita sobre a mucosa intestinal pode alterar a permeabilidade das células, e com isso, quebrar a função do epitélio como barreira[19,20].

Excluído: ¶

Diante disso, tem sido crescente o interesse dos pesquisadores em investigar as substâncias secretadas e/ou excretadas pelos trofozoítos de *Giardia* com o propósito de identificar aquelas que possam estar diretamente envolvidas na relação parasita-hospedeiro. Até o presente, sabe-se que

trofozoítos de *Giardia* apresentam uma variedade de substâncias potencialmente tóxicas, entre as quais destacam-se proteínas e lectinas que podem ser responsáveis por causar injúrias no epitélio intestinal[16,21].

Entre as proteínas de *Giardia* que têm sido alvo de investigações incluem-se aquelas que apresentam atividade catalítica, mais precisamente, as proteases. Essas moléculas, também denominadas enzimas proteolíticas, caracterizam-se pela capacidade de catalisar a hidrólise das ligações entre os peptídeos de uma proteína[22].

As proteases constituem uma grande família e geralmente têm sido classificadas com base em dois critérios principais: (1) o tipo de reação catalisada e (2) a natureza química do sítio catalítico. De acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia, as proteases podem ser subdivididas em endopeptidases e exopeptidases. Além disso, baseando-se no grupo funcional presente no sítio ativo, as endopeptidases podem ser ainda classificadas em quatro grupos principais: serina-proteases, cisteína-proteases ou tiol proteases, metalo-proteases e aspartil-proteases[22].

Essas enzimas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo ser identificadas em diferentes sistemas biológicos, desde vírus até vertebrados. Atualmente, as proteases dos parasitas têm despertado grande interesse dos pesquisadores, sendo que a identificação e a caracterização dessas moléculas abrangem um grande volume de investigações, em especial, no que se refere às proteases ligadas à membrana de superfície e àquelas que são excretadas e/ou secretadas. Nesses organismos, as proteases podem desempenhar papel importante em processos como (1) invasão dos tecidos do

hospedeiro, (2) digestão de proteínas específicas do hospedeiro importantes para o metabolismo do parasita, (3) imuno-evasão e modulação da resposta imune do hospedeiro, (4) multiplicação e diferenciação dos parasitas seja, por exemplo, no encistamento e desencistamento dos protozoários ou nos processos de eclosão e muda dos helmintos e artrópodes[22]. Somando-se a esses aspectos, vale destacar que muitas proteases presentes nos parasitas são imunogênicas, e com isso tem-se explorado a possibilidade de que possam ser empregadas como marcadores para o diagnóstico imunológico de algumas doenças parasitárias. Além disso, o envolvimento dessas moléculas no ciclo de vida de organismos causadores de doença tem tornado-as alvo potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos e vacinas contra algumas infecções[23].

Durante os últimos 20 anos, têm-se observado avanços significativos na elucidação de processos celulares que envolvem a proteólise, principalmente, em relação às infecções parasitárias causadas por protozoários importantes como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp, *Plasmodium* spp*, Entamoeba histolytica, Acanthamoeba* spp e *Trichomonas vaginalis*. Dentre as informações relevantes, destaca-se a identificação de cisteína-proteases que participam diretamente do ciclo de vida, morfogênese e infectividade desses parasitas. Além disso, muitos desses parasitas liberam proteínas com atividade enzimática como produtos de excreção/secreção, que *in vivo* podem estar envolvidas em mecanismos importantes da interação parasita-hospedeiro[22].

Com respeito à *Giardia*, pouco é conhecido, apesar de existirem evidências de que a proteólise esteja envolvida na sua nutrição, desenvolvimento e patogenicidade[11].

Diante dos resultados obtidos em várias investigações[24,25,26,27,28] que demonstram a presença de diferentes proteases, principalmente cisteína-proteases em trofozoítos de *Giardia*, tem-se especulado sobre as possíveis funções dessas enzimas. Uma delas parece estar associada ao ciclo evolutivo do parasita, uma vez que estudos recentes têm demonstrado a participação de cisteína-proteases e aminopeptidases no processo de diferenciação dos cistos para trofozoítos e dos trofozoítos para cistos, respectivamente[29,30]. Recentemente, TOUZ[30] e colaboradores fizeram observações importantes quanto à participação dessas moléculas no processo de encistamento do parasita. Esses pesquisadores demonstraram *in vitro* que a bestatina, um inibidor de aminopeptidases, bloqueia a formação de cistos impedindo a expressão de genes necessários para a formação da parede cística. Portanto, esses resultados sugerem que eventos enzimáticos envolvendo proteases específicas são necessários no processo de encistamento.

A despeito do envolvimento de enzimas proteolíticas em processos biológicos, a possibilidade de que essas moléculas sejam liberadas como produtos de excreção/secreção por trofozoítos de *Giardia*, pode ser de grande interesse para a compreensão tanto da interação parasita-hospedeiro quanto do mecanismo responsável por alterações que ocorrem na superfície da mucosa intestinal durante a infecção.

Excluído: ¶

Os estudos realizados para a caracterização bioquímica dos produtos de excreção/secreção de *Giardia* são recentes, entretanto, a hipótese de que trofozoítos liberam substâncias potencialmente tóxicas e capazes de causar alterações na mucosa intestinal é remota. No ano de 1969, ALP & HISLOP[31] propuseram que os trofozoítos desse protozoário produziriam substâncias tóxicas capazes de interagir diretamente com as células absortivas. Mais tarde, em 1979, MEYER & RADULESCU[32] sugeriram que as proteínas de excreção/secreção de *Giardia* seriam responsáveis pelos quadros de diarréia durante a infecção.

Posteriormente, empregando ensaios *in vitro*, outros autores demonstram a habilidade de filtrados de culturas de trofozoítos causarem danos aos fibroblastos em cultura e promoverem a redução da absorção de sais e água em ratos com intestino perfundido[33]. Mais recentemente, na tentativa de explicar alterações morfológicas e funcionais do epitélio intestinal, alguns autores[16,21,34,35] discutem sobre a possibilidade de que esses produtos possam atuar como toxinas sobre a mucosa duodenal do hospedeiro, alterando as vilosidades e, desta forma, inibindo a absorção de nutrientes e a atividade enzimática. Além disso, esses autores sugerem que as alterações na mucosa, também, poderiam ser devido a um processo inflamatório local desencadeado em resposta aos produtos de excreção/secreção, uma vez que entre as proteínas liberadas pelos trofozoítos estão antígenos relevantes do parasita.

De acordo com resultados obtidos em diferentes estudos, proteínas presentes na superfície de trofozoítos de *Giardia* são excretadas e secretadas durante o crescimento *in vitro* de trofozoítos[4,16,21,26,35,36]. Entretanto, a natureza

e o papel dessas moléculas na imunobiologia e patofisiologia da infecção ainda não estão claros.

No que se refere à natureza bioquímica dos produtos de excreção/secreção de *Giardia*, JIMÉNEZ et al.[26] reportaram, pela primeira vez, a atividade proteolítica de proteínas presentes em sobrenadantes de culturas da cepa-referência Portland 1 e demonstraram o predomínio de proteases do tipo cisteína. A seguir, em 2004, esse mesmo autor e colaboradores demonstraram *in vivo* que, a administração oral de produtos de excreção/secreção em camundongos induz alterações no epitélio intestinal, semelhantes àquelas observadas em animais de experimentação infectados a partir da ingestão de cistos[35].

Apesar dos estudos realizados até o presente, ainda são necessárias pesquisas que forneçam mais informações sobre a natureza e a real função biológica das proteases de *Giardia*, incluindo àquelas que são liberadas sob a forma de produtos de excreção/secreção. Além disso, é importante destacar que a maioria das investigações relacionadas à atividade proteolítica de *Giardia*, tem identificado e caracterizado proteases de trofozoítos de cepas isoladas e axenizadas em regiões onde a incidência da giardíase é geralmente menor do que nos países em desenvolvimento. Com isso, fica evidente a necessidade de estudos mais detalhados para a identificação e caracterização das proteases de cepas isoladas em regiões onde a giardíase é endêmica e onde tem sido constante a busca por medidas que permitam o seu controle.

Entre os poucos estudos de caracterização de proteínas de trofozoítos de cepas de *Giardia* isoladas no Brasil[27,28,37,38], incluem-se as pesquisas realizadas com as cepas autóctones do Estado de São Paulo[27,28,38].

Inicialmente, GUIMARÃES et al.[38] identificaram glicoproteínas e antígenos característicos entre as proteínas presentes em preparações de trofozoítos de duas cepas autóctones. Posteriormente, esses mesmos autores[27], empregando géis contendo gelatina como substrato, demonstraram que várias proteases estão presentes em lisados de trofozoítos de cepas isoladas em nosso meio, nas quais predominam a atividade de cisteína-proteases. Em estudo recente, CORADI & GUIMARÃES[28] relataram que proteases presentes em lisados de trofozoítos de cinco cepas autóctones são capazes de degradar substratos protéicos como gelatina, colágeno, BSA, caseína e hemoglobina. Além disso, esses autores se referem ao predomínio de cisteína-proteases e evidenciam a atividade de serina-proteases, aspartil-proteases e aminopeptidases. Mais recentemente, em estudo realizado pelo mesmo grupo[39], atividade proteolítica foi detectada em frações de proteínas purificadas a partir de lisados de trofozoítos de uma cepa isolada e axenizada no Brasil. Entre 30 frações obtidas por cromatografia líquida, a proteólise foi evidente em apenas quatro delas, nas quais predominou a atividade de cisteína-proteases.

Dessa forma, aliando as evidências de que os produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *Giardia* possam estar envolvidos em mecanismos relevantes da interação parasita-hospedeiro ao interesse em dar continuidade à identificação e caracterização de proteases de cepas

autóctones, o presente trabalho tem por objetivo iniciar os estudos de caracterização bioquímica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *Giardia* de uma cepa isolada e axenizada no Brasil, tendo por referência a cepa-padrão Portland 1, isolada e axenizada nos Estados Unidos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- O presente estudo foi proposto visando identificar e caracterizar bioquimicamente os produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *Giardia duodenalis* de cepa isolada e axenizada em Botucatu em comparação com a cepa-referência Portland 1 (EUA).

Objetivos específicos

- Analisar o perfil eletroforético dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos.

- Avaliar a atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos em géis contendo gelatina e colágeno como substratos.

- Avaliar a atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos em ensaios empregando a hemoglobina como substrato.

- Caracterizar as proteases quanto à classe, avaliando o efeito de diferentes inibidores sintéticos sobre a atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos nos diferentes substratos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS[1]

3.1. Cepas de *Giardia duodenalis*

[1] Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp. Protocolo nº 153/2006-CEP.

Os trofozoítos de *Giardia duodenalis* utilizados neste trabalho pertencem a duas cepas axênicas obtidas de pacientes e mantidas no Laboratório de Giardíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências/Unesp/Botucatu/SP.

3.1.1. Portland 1 (P-1)

Cepa isolada e axenizada nos Estados Unidos (Portland, Oregon) por MEYER[40], a partir de aspirado duodenal de paciente do sexo feminino com giardíase crônica, caracterizada por diarréia freqüente. Esta cepa foi fornecida ao Laboratório de Giardíase do Departamento de Parasitologia IB/UNESP/Botucatu pela Dra Honorine Ward Pillai, da Division of Geografic Medicine Tufts University, New England Medical Center, Boston, U.S.A, e foi empregada como amostra referência.

3.1.2. BTU-11 (91/JFC)

Cepa isolada e axenizada pela Dra Maria Inês T. L. Sogayar, no Laboratório de Giardíase do Departamento de Parasitologia IB/UNESP/Botucatu, a partir de cistos de paciente do sexo masculino, proveniente de São Paulo, apresentando giardíase sintomática e crônica, caracterizada por diarréia freqüente, flatulência e dor abdominal, além de marcante resistência à terapêutica convencional.

3.2. Manutenção das cepas de *G. duodenalis*

Os cultivos axênicos de trofozoítos de *Giardia* foram mantidos em tubos Vacutainer® (5 ml) contendo meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina, em estufa a 37°C[41]. Para a manutenção dos cultivos, os repiques foram feitos a cada 72-96 horas, retirando-se do meio exaurido uma suspensão de trofozoítos (aproximadamente 10^4 trofozoítos/0,01 ml) e transferindo-a para um tubo contendo meio novo.

3.3. Obtenção dos produtos de excreção/secreção (PE/S)

Produtos de excreção/secreção de trofozoítos axênicos de *G. duodenalis* foram obtidos segundo a metodologia descrita por JIMÉNEZ et al.[26,35]. Inicialmente, para cada cepa, trofozoítos foram repicados em lotes de seis a 12 tubos de cultura. Após 72 horas, trofozoítos na fase log (exponencial) de crescimento, aderidos à parede dos tubos de cultura, foram separados dos organismos soltos ou mortos, desprezando-se o meio TYI-S-33 e substituindo-o por meio RPMI-1640 contendo glutamina 20 mM e suplementado com cisteína 11,4 mM; ácido ascórbico 11,4 mM; HEPES 20 mM e 0,1 µg de Vancomicina®/0,1 ml de meio. Em seguida, os tubos foram mantidos a 37°C durante seis horas e após a incubação, o meio foi recolhido para a obtenção das proteínas de excreção/secreção e os trofozoítos aderidos aos tubos foram ressuspendidos em PBS 0,1 M (pH 7,2) e submetidos à centrifugação (2000g/10 min a 4°C) para posterior determinação do número de parasitas em câmara de Neubauer (hemocitômetro).

O meio condicionado pelos trofozoítos foi centrifugado a 2000g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo os PE/S foi filtrado em membrana 0,22 µm. A uma parte desse material foram adicionados os seguintes inibidores de proteases: IAA, PMSF, TPCK e TLCK na concentração de 1 mM. Em seguida, cada 5 ml do sobrenadante filtrado, tratado e não tratado com inibidores, foi concentrado em membrana de diálise contra 1g de Sephadex G-50 (Sigma) ou de Aquacide II (Calbiochem), durante seis horas a 4°C. Após a concentração, os sobrenadantes de cultura reduzidos em aproximadamente um terço do volume inicial foram aliquotados e estocados a - 80°C, até o momento do uso.

3.4. Determinação da concentração de proteínas dos produtos de excreção/secreção

A dosagem das proteínas totais presentes nos produtos de excreção/secreção de *G. duodenalis* foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA - Protein Assay Reagent Kit - Pierce), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

3.5. Análise do perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*

3.5.1. Eletroforese das proteínas dos produtos de excreção/secreção

Para a determinação do perfil protéico, os PE/S de cada cepa, previamente tratados com inibidores de proteases, foram fracionados em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE), sob condições redutoras e em sistema descontínuo[42]. O fracionamento das proteínas foi feito em géis de gradiente de 7-14% de acrilamida e as preparações de proteínas aplicadas no gel foram diluídas em tampão da amostra 5x (SDS 10%; 2-mercaptoetanol 128 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,5%; Tris/HCl 500 mM pH 6,8) e fervidas durante dois minutos. Para a realização das eletroforeses, foram testadas diferentes concentrações de proteína/canaleta (5 e 11 μg) dos PE/S concentrados com Sephadex G-50 ou com Aquacide II. Amostras do meio RPMI também foram aplicadas aos géis. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical Mini-VE Hoeffer (Pharmacia) empregando-se tampão de corrida (Tris/HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,6) e sob corrente constante de 90 volts. Além das amostras, um padrão de peso molecular foi incluído em todas as corridas, a fim de se estimar a massa molecular aparente das proteínas presentes nos PE/S. Foram utilizados, o padrão SDS-6H (Sigma) composto pelas proteínas: miosina (205 kDa), β-galactosidade (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e a anidrase carbônica (29 kDa) e os padrões HMW e LMW (Pharmacia) compostos pelas proteínas: miosina (220 kDa), α_2-macroglobulina (170 kDa), β-galactosidade (116 kDa), fosforilase b (97

kDa), transferrina (76 kDa), albumina (66 kDa), desidrogenase glutâmica (53 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e a α-lactalbumina (14,4 kDa).

3.5.2. Coloração dos géis pela prata

Para a visualização das bandas de proteínas fracionadas por SDS-PAGE, os géis foram corados com nitrato de prata[43]. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram fixados com metanol a 50% por no mínimo uma hora, rehidratados por 20 minutos em água contendo formaldeído a 0,037% e lavados duas vezes (10 minutos cada lavagem) em água destilada. Em seguida foram incubados em solução de prata amoniacal, sob agitação lenta e na ausência de luz por 20 minutos. Após a incubação em solução corante, os géis foram lavados em água destilada por 15 minutos e incubados por 10 minutos em solução reveladora (citrato a 2,5% e formaldeído a 37%). Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida pela adição de solução inativadora (metanol a 45% e ácido acético a 10%).

3.5.3. Determinação dos pesos moleculares

Após a visualização das bandas, as massas moleculares aparentes das frações protéicas foram determinadas mediante a construção de curvas-padrão, tomando como referência a mobilidade de cada uma das proteínas do padrão de peso molecular.

3.6. Análise da atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis* sobre substratos protéicos

3.6.1. Atividade das proteases em géis de SDS-PAGE copolimerizados com gelatina e colágeno

A atividade proteolítica dos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 foi avaliada em géis copolimerizados com gelatina e colágeno, segundo metodologia descrita por WILLIAMS & COOMBS[25], com modificações. Os PE/S sem tratamento prévio com inibidores de proteases foram diluídos em tampão da amostra 5x (SDS 10%; 2-mercaptoetanol 128 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,5%; Tris/HCl 500 mM; pH 6,8) e aplicados aos géis. Para a realização das eletroforeses, foram testadas diferentes concentrações de proteína/canaleta (30 e 40 μg) dos PE/S concentrados com Aquacide II. As análises dos perfis de hidrólise foram realizadas em gel de poliacrilamida 7-14% copolimerizado com gelatina a 0,2% (Royal®) e em gel a 15% contendo

colágeno tipo I a 0,2% (Sigma). Além das amostras, um padrão de peso molecular foi incluído em todas as corridas. Ao final da migração eletroforética realizada a 90 V e a 4°C, os géis foram incubados em Triton X-100 a 2,5% durante 30 minutos a 37°C e sob agitação constante. Em seguida, os géis foram incubados em tampão fosfato 0,1M (pH 5,5) contendo ditiotreitol (DTT; Sigma) a 3 mM durante 16 horas a 37°C. Para a visualização das bandas de proteólise, os géis foram corados com amido black 0,1% em metanol/ácido acético/água (30:10:60) durante uma hora e descorados neste mesmo solvente[44] .

3.6.2. Degradação da hemoglobina

A atividade proteolítica dos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 sobre a hemoglobina foi analisada segundo metodologia descrita por KIM et al.[45], com modificações. As amostras dos PE/S sem tratamento prévio com inibidores de proteases e concentradas com Aquacide II foram incubadas com o substrato a 37°C e a atividade proteolítica foi avaliada após 16 horas. As reações foram realizadas em microtubos e além dos tubos contendo a enzima com o substrato, dois controles foram incluídos em cada ensaio: o controle da enzima (tubo contendo apenas o PE/S) e o controle do substrato (tubo contendo apenas hemoglobina). Durante os ensaios, a cada um dos PE/S contendo 20 μg de proteína, foram adicionados 20 μl de hemoglobina a 0,1% (1 mg de substrato/1 ml de tampão fosfato pH 5,5). Em seguida, os microtubos foram mantidos sob incubação a 37°C durante 16 horas e após esse período, a

reação foi interrompida acrescentando-se tampão da amostra. Esse material foi aplicado em géis SDS-PAGE 12% e a corrida eletroforética foi realizada a 90 V e a 4°C. Para a visualização dos produtos de degradação da hemoglobina, os géis foram corados com solução de prata amoniacal, segundo protocolo descrito no item 3.5.2.

3.7. Efeito de inibidores sobre a atividade das proteases

Para analisar a inibição da atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *Giardia* foram testados diferentes inibidores sintéticos de proteases e as respectivas concentrações empregadas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1. Inibidores sintéticos de proteases

Inibidores	Concentração solução-estoque (mM)	Concentração nos ensaios (mM)	Enzimas alvo
E-64	7,0	0,1	Cisteína-proteases
IAA	50,0	1,0	Cisteína-proteases
PMSF	250,0	1,0	Serina-proteases
TPCK	20,0	1,0	Serina-proteases
TLCK	10,0	1,0	Serina-proteases
Leupeptina	10,0	0,01	Serina-proteases
Elastatinal	10,0	0,1	Serina-proteases
DCI	10,0	0,1	Serina-proteases
Pepstatina	2,0	0,1	Aspartil-proteases
EDTA	100,0	5,0	Metalo-proteases
Fenantrolina	200,0	10,0	Metalo-proteases

A concentração de cada inibidor empregado foi escolhida considerando a faixa de atividade de cada uma das substâncias, de acordo com BEYNON & BOND[46].

Nos ensaios realizados em géis de poliacrilamida copolimerizados com o substrato, após a corrida eletroforética das amostras e incubação com Triton X-100 por 30 minutos, os géis foram incubados em tampão fosfato 0,1 M (pH 5,5) contendo DTT a 3 mM e o inibidor a ser testado, durante 16 horas e 37°C, sob agitação constante[25]. Após esse período, os géis foram corados com amido black 0,1%[44].

Para a avaliação do efeito de inibidores sobre a degradação da hemoglobina, as amostras contendo os PE/S foram pré-incubadas com cada um dos inibidores em suas respectivas concentrações (Tabela 1). Em cada microtubo, os PE/S foram incubados com cada um dos inibidores por 30 minutos a 37°C. Após esse período os ensaios foram conduzidos como descrito no item 3.6.2.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise do perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*

A análise dos perfis eletroforéticos das proteínas presentes nos PE/S das cepas, previamente tratados com inibidores de proteases está apresentado na Figura 1. Nessa foto estão incluídos os perfis protéicos dos sobrenadantes de cultura concentrados com Sephadex G-50 (Figura 1A) e com Aquacide II (Figura 1B).

O perfil eletroforético dos PE/S concentrados com Sephadex revelou um padrão simples, no qual se distinguem apenas três bandas de proteínas de aproximadamente, 67, 54 e 47 kDa. Os perfis das duas cepas foram similares e dentre as proteínas detectadas, destaca-se a banda de massa molecular de 67 kDa (Figura 1A). Todas as bandas de proteínas observadas foram comuns aos perfis das cepas analisadas (Figura 1A).

Com relação aos sobrenadantes de cultura concentrados com Aquacide II, a análise eletroforética revelou padrões distintos quanto ao número de bandas visualizadas (Figura 1B). Nos PE/S da cepa BTU-11, foi possível distinguir apenas quatro bandas com massas moleculares aparentes de 110, 69, 55 e 28 kDa. Já no perfil da cepa P-1, foram identificadas seis bandas de proteínas distribuídas na faixa de 123 a 28 kDa e com as seguintes massas moleculares: 123, 110, 81, 69, 55 e 28 kDa.

Comparando as cepas BTU-11 e P-1, observa-se que as bandas de proteínas de aproximadamente 110, 69, 55 e 28 kDa estão presentes em ambos os perfis, destacando-se a banda de aproximadamente 69 kDa.

Diferenças foram detectadas no padrão de migração das proteínas dos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 nas duas concentrações protéicas empregadas (5 e 11 µg de proteína/canaleta). Bandas mais evidentes foram observadas nos perfis obtidos com 11 µg/canaleta.

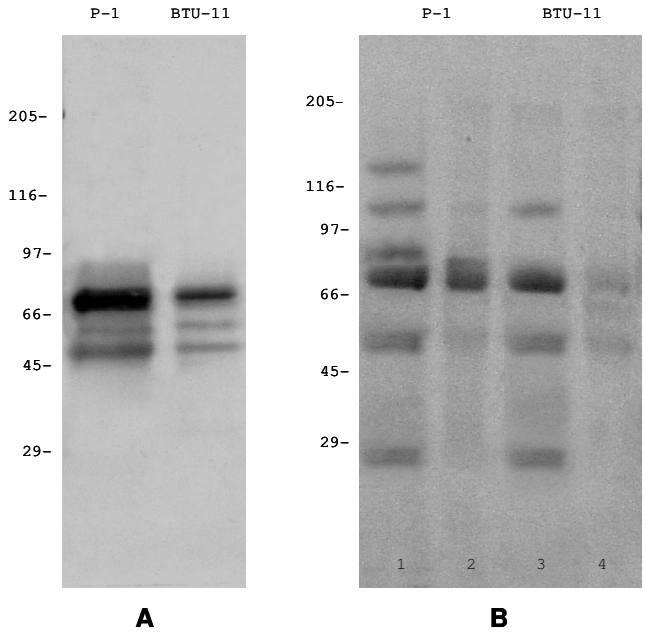


Figura 1- Perfil protéico dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* das cepas P-1 e BTU-11 em gel de poliacrilamida 7-14% e coloração pela prata. **A:** PE/S concentrados com Sephadex G-50. **B:** PE/S concentrados com Aquacide II. Os números 1 e 3 e 2 e 4 referem-se, respectivamente, às concentrações de 11 e 5 µg de proteína/canaleta. Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

4.2. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*

4.2.1. Análise do perfil de hidrólise em géis SDS-PAGE copolimerizados com substratos protéicos

A atividade proteolítica dos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 foi avaliada em géis contendo gelatina e colágeno tipo I e, nesses ensaios, ambos os substratos foram degradados pelas enzimas presentes nas preparações analisadas (Figuras 2 e 3). Entre as concentrações protéicas testadas para a obtenção dos zimogramas, optou-se por empregar 40 µg e 30 µg de proteína/ canaleta, respectivamente, para as análises em géis copolimerizados com gelatina e com colágeno. Vale destacar que, em todas as concentrações testadas, os PE/S produziram hidrólise dos substratos, entretanto, nas concentrações selecionadas, a hidrólise foi mais intensa e evidente.

4.2.1.1. Zimograma em géis SDS-PAGE – Gelatina

Os perfis de hidrólise da gelatina produzidos pelos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 estão apresentados na Figura 2. É evidente a degradação do substrato pelos PE/S de *G.duodenalis*, além do que os padrões de hidrólise foram similares nas duas cepas.

A atividade gelatinolítica foi detectada na faixa de 77 a 18 kDa, destacando-se seis bandas de hidrólise de aproximadamente 77, 66, 54, 52, 21 e 18 kDa.

4.2.1.2. Zimograma em géis SDS-PAGE – Colágeno

Na Figura 3 estão apresentados os padrões de hidrólise produzidos pelos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 sobre o colágeno.

A atividade colagenolítica dos PE/S foi similar nas duas cepas em estudo, observando-se zona de hidrólise que se estende de 145 a 18 kDa. A zona de hidrólise que mais se destaca foi identificada na faixa de 145 a 82 kDa. Nessa região de migração, as áreas de hidrólise mais evidentes incluem as de aproximadamente 145, 96 e 82 kDa. Além dessas, uma zona de hidrólise difusa na faixa de 56 a 34 kDa pode ser observada, destacando-se uma banda mais evidente na região correspondente a 34 kDa. Ao final da região de migração, foi possível identificar uma banda de aproximadamente 18 kDa.

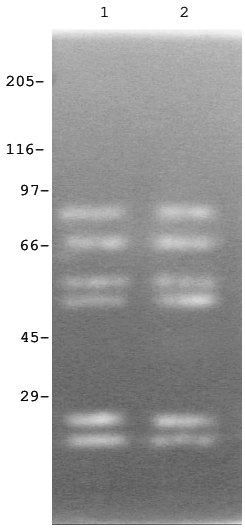


Figura 2- Atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* em gel de poliacrilamida 7-14% copolimerizado com gelatina a 0,2% e coloração pelo amido black. Zimograma dos PE/S das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

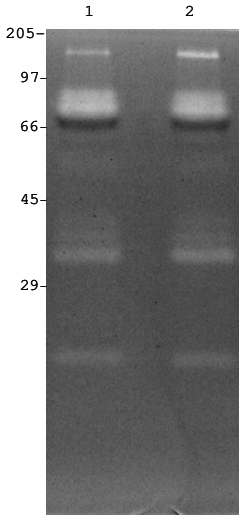


Figura 3- Atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* em gel de poliacrilamida 15% copolimerizado com colágeno tipo I a 0,2% e coloração pelo amido black. Zimograma dos PE/S das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

4.3. Perfil de degradação da hemoglobina

Para verificar a atividade das proteases presentes nos PE/S das cepas P-1 e BTU-11 sobre a hemoglobina, após a incubação da enzima com o substrato, os produtos de degradação produzidos foram avaliados em géis SDS-PAGE (Figura 4). Para a análise dos padrões de degradação tomou-se como referência o perfil de migração da hemoglobina, no qual é possível distingüir duas bandas com massas moleculares de aproximadamente 34 e 15 kDa. Essas bandas de proteínas correspondem, respectivamente, a cadeia dimérica e monomérica do substrato (Figura 4, linhas 1 e 3).

Perfis de lise similares foram observados quando a hemoglobina foi exposta aos PE/S das duas cepas em estudo (Figura 4, linhas 2 e 4). Os resultados indicam degradação total da banda dimérica e lise parcial do monômero. Nos perfis de hidrólise, após a degradação da cadeia monomérica, o peptídeo de aproximadamente 15 kDa apresenta-se como uma banda mais tênue em comparação com o perfil da hemoglobina pura.

4.4. Efeito de inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *G. duodenalis*

Os perfis de hidrólise produzidos pelos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 após ensaios com diferentes inibidores sintéticos de proteases estão apresentados nas Figuras 5 a 11.

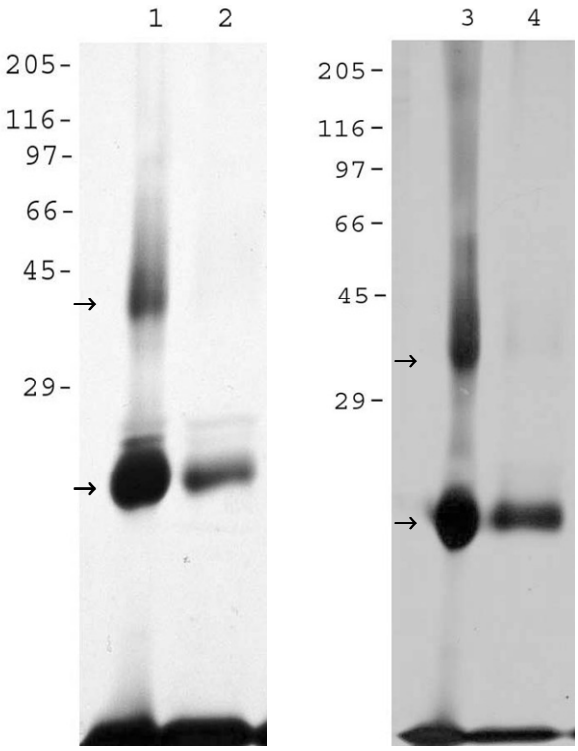


Figura 4 - Degradação da hemoglobina a 0,1% pelos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis*. Perfil eletroforético da hemoglobina (1 e 3) e dos produtos de degradação do substrato (2 e 4) após incubação com os PE/S das cepas BTU-11 (2) e P-1 (4). Setas indicam as cadeias dimérica (34 kDa) e monomérica (15 kDa) da hemoglobina. Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

4.4.1. Perfis de hidrólise em géis SDS-PAGE–Gelatina tratados com inibidores

Entre todos os inibidores testados, apenas E-64, IAA e TLCK promoveram inibição marcante da atividade enzimática da maioria das proteases, exceto daquela correspondente à banda de hidrólise de aproximadamente 66 kDa (Figura 5).

A hidrólise da gelatina foi também reduzida pela leupeptina, conhecido inibidor da atividade de cisteína e serina-proteases. Esse efeito só não foi observado sobre as bandas de aproximadamente 66 e 18 kDa (Figura 5).

Quanto ao efeito dos inibidores TPCK e elastatinal, essas substâncias também inibiram a atividade enzimática de algumas proteases. A incubação do gel em tampão contendo TPCK não promoveu a inibição das bandas de hidrólise de aproximadamente 77, 66 e 18 kDa (Figura 5), enquanto que o elastatinal não demonstrou efeito sobre as proteases correspondentes às bandas de 66, 21 e 18 kDa (Figura 6).

Nos géis tratados com os inibidores de serina (PMSF e DCI), metalo (fenantrolina e EDTA) e aspartil (pepstatina) proteases, não ocorreu inibição da atividade enzimática das proteases e, portanto, os perfis de proteólise foram semelhantes aquele observado no gel não tratado com inibidores (Figuras 6 e 7).

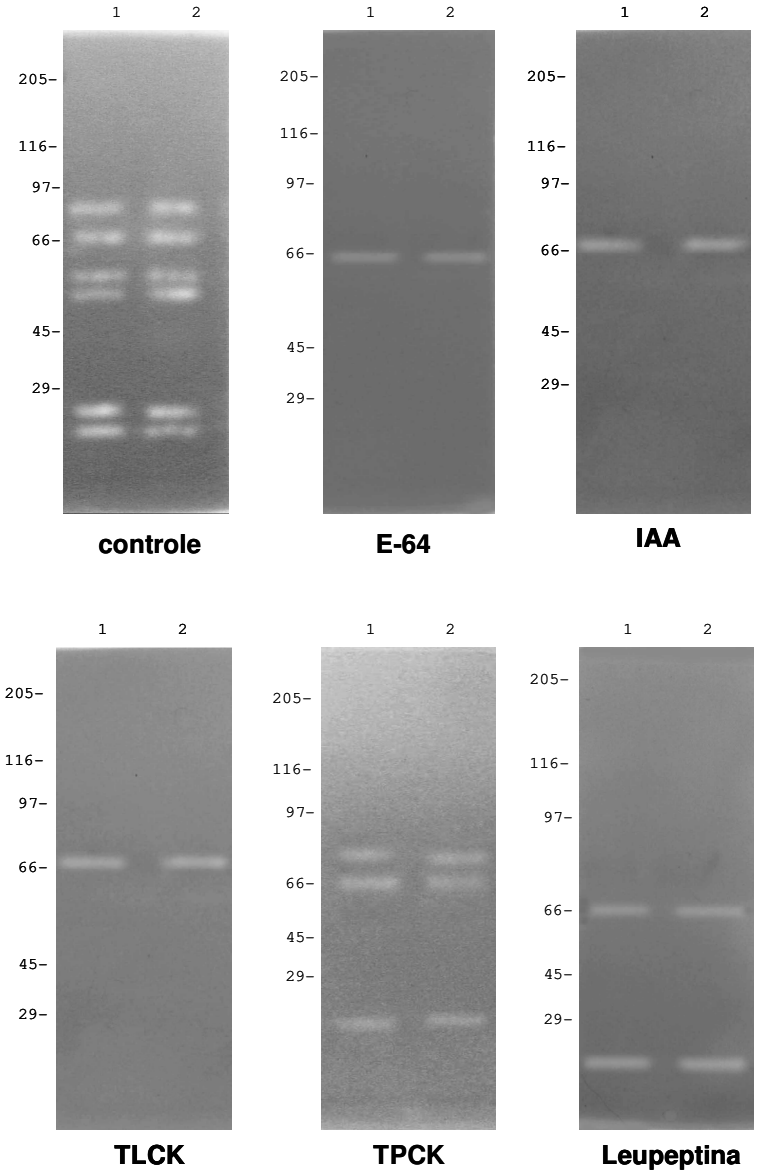


Figura 5- Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2) em gel de poliacrilamida 7-14% copolimerizado com gelatina a 0,2% e coloração pelo amido black. PE/S na ausência (controle) e presença dos inibidores (E-64, IAA, TLCK, TPCK e leupeptina). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

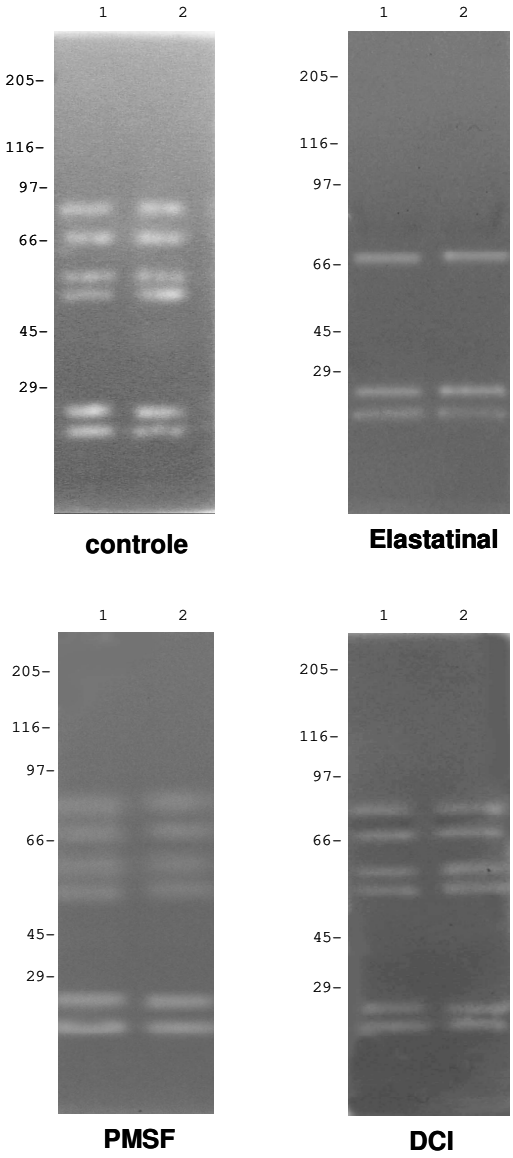


Figura 6- Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2) em gel de poliacrilamida 7-14% copolimerizado com gelatina a 0,2% e coloração pelo amido black. PE/S na ausência (controle) e presença dos inibidores (elastatinal, PMSF e DCI). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

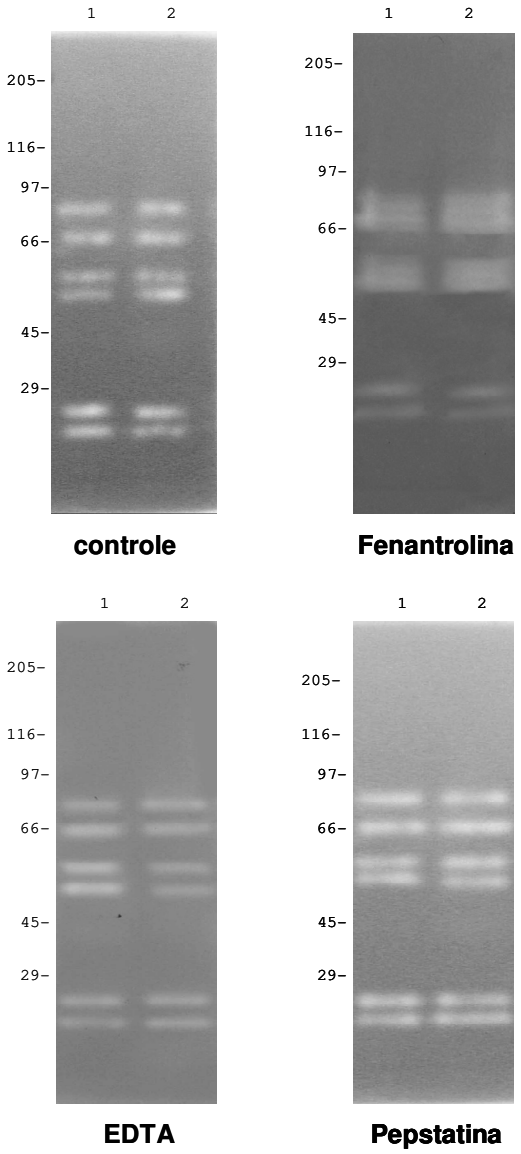


Figura 7- Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2) em gel de poliacrilamida 7-14% copolimerizado com gelatina a 0,2% e coloração pelo amido black. PE/S na ausência (controle) e presença dos inibidores (fenantrolina, EDTA e pepstatina). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

4.4.2. Perfis de hidrólise em géis SDS-PAGE–Colágeno tratados com inibidores

Os perfis de hidrólise do colágeno após incubação dos géis com os inibidores de proteases estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

A atividade de todas as proteases presentes nos PE/S foi totalmente inibida pela adição de E-64 e de leupeptina, inibidores de cisteína-proteases e de serina e cisteína-proteases, respectivamente (Figura 8).

TPCK e TLCK promoveram inibição marcante da atividade enzimática da maioria das proteases, contudo esses inibidores não demonstraram efeito sobre algumas zonas de hidrólise. Assim, as bandas de proteólise correspondes às áreas de migração de aproximadamente 96 e 82 kDa não foram inibidas por essas substâncias. Além dessas, a banda de 145 kDa não foi inibida pelo TPCK (Figura 8).

Nos géis incubados com os inibidores PMSF, EDTA, fenantrolina e pepstatina, os perfis de hidrólise foram semelhantes aos observados no gel não tratado com inibidor (Figuras 8 e 9).

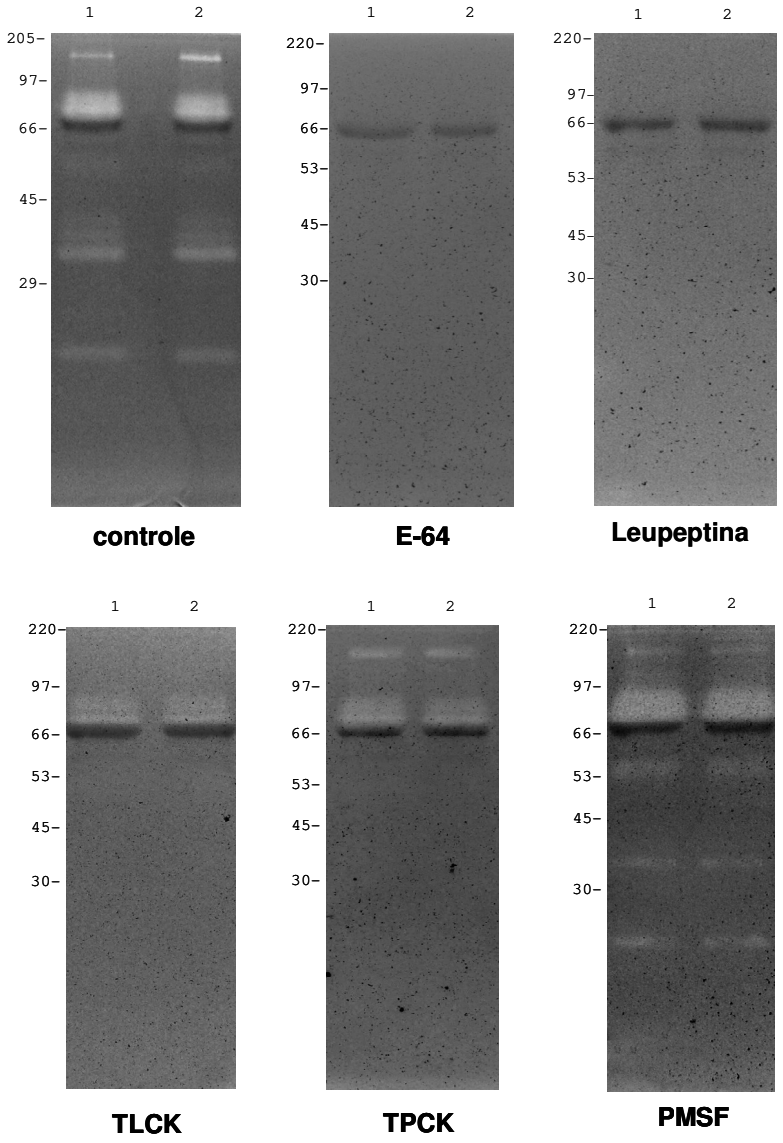


Figura 8- Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2) em gel de poliacrilamida 15% copolimerizado com colágeno tipo I a 0,2% e coloração pelo amido black. PE/S na ausência (controle) e presença dos inibidores (E-64, leupeptina, TLCK, TPCK e PMSF). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

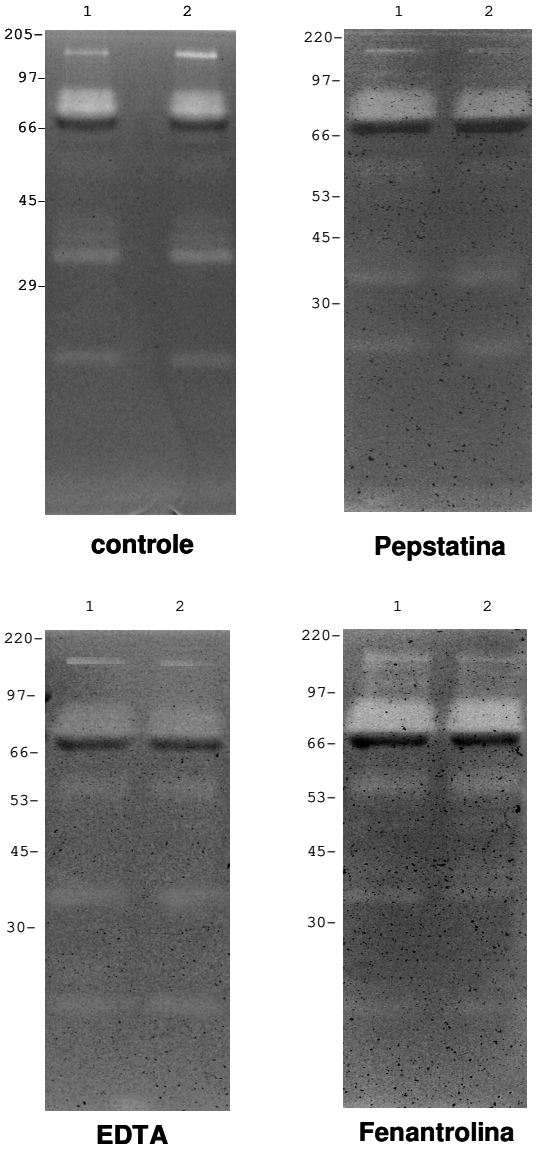
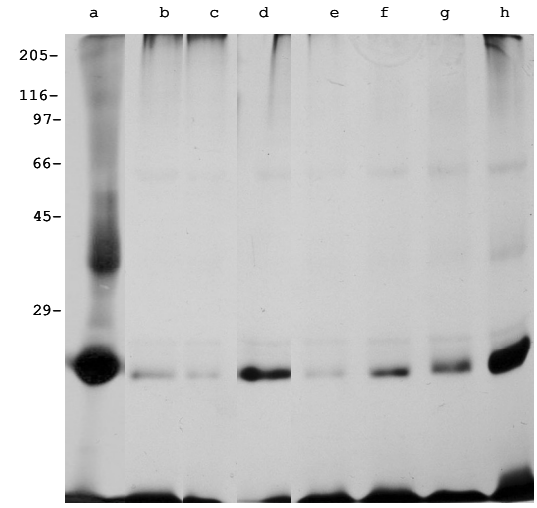


Figura 9- Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* das cepas BTU-11 (1) e P-1 (2) em gel de poliacrilamida 15% copolimerizado com colágeno tipo I a 0,2% e coloração pelo amido black. PE/S na ausência (controle) e presença dos inibidores (pepstatina, EDTA e fenantrolina). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

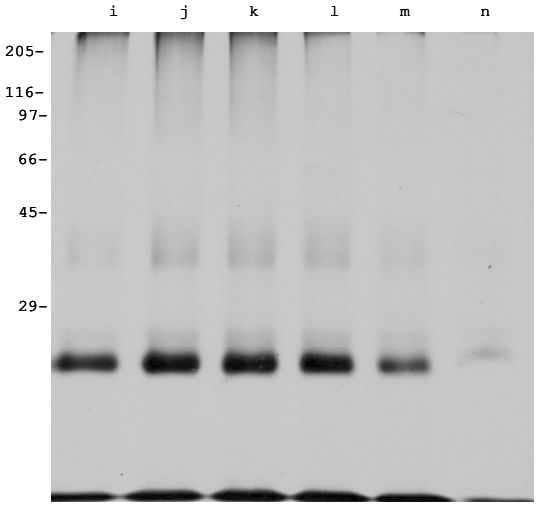
4.4.3. Perfis de hidrólise da hemoglobina após tratamento dos PE/S com inibidores

Nas figuras 10 e 11, encontram-se os perfis de hidrólise da hemoglobina, após a incubação do substrato com os PE/S previamente tratados com inibidores sintéticos de proteases.

Comparando-se os perfis de hidrólise produzidos pelos PE/S de ambas as cepas, tratados e não tratados com inibidores, observa-se que a única substância que produziu inibição da atividade enzimática foi o TLCK. Na presença desse inibidor, a atividade das proteases sobre a hemoglobina foi discretamente reduzida, em especial no que se refere à degradação da cadeia monomérica, cujo perfil é similar ao observado com a hemoglobina pura. Nas amostras tratadas com os outros inibidores testados, é evidente a degradação total do dímero e a lise parcial da cadeia monomérica da hemoglobina.

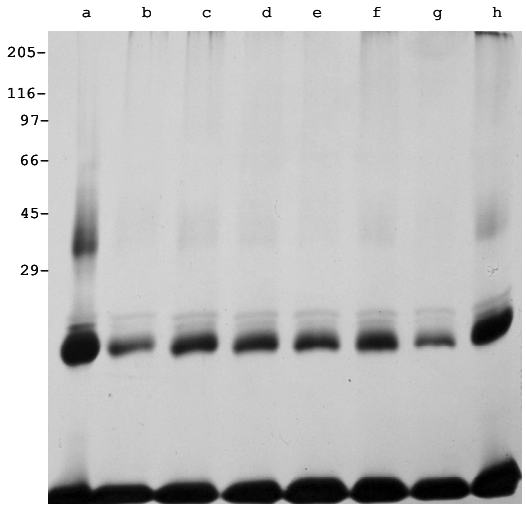


A

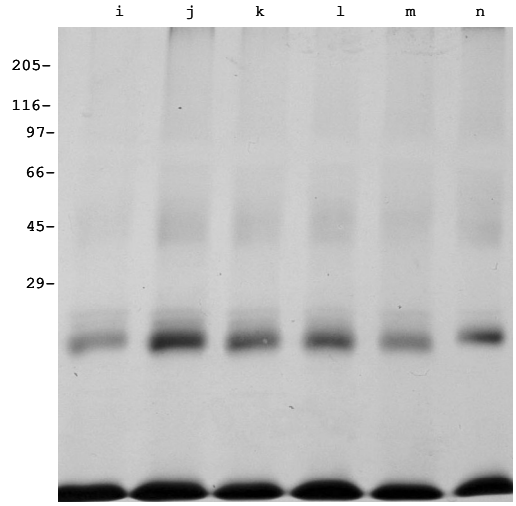


B

Figura 10- Efeito de inibidores sobre a degradação da hemoglobina pelos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* da cepa P-1 em gel de poliacrilamida 12% e coloração pela prata. **A** e **B:** molécula de hemoglobina (a), degradação da hemoglobina pelos PE/S na ausência (b e i) e na presença de E-64 (c), IAA (d), PMSF (e), leupeptina (f), TPCK (g), TLCK (h), elastatinal (j), DCI (k), pepstatina (l), EDTA (m) e fenantrolina (n). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.



A



B

Figura 11- Efeito de inibidores sobre a degradação da hemoglobina pelos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis* da cepa BTU-11 em gel de poliacrilamida 12% e coloração pela prata. **A** e **B:** molécula de hemoglobina (a), degradação da hemoglobina pelos PE/S na ausência (b e i) e na presença de E-64 (c), IAA (d), PMSF (e), leupeptina (f), TPCK (g), TLCK (h), elastatinal (j), DCI (k), pepstatina (l), EDTA (m) e fenantrolina (n). Marcador de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O conhecimento da composição e da natureza das proteínas dos parasitas, em especial, àquelas com atividade catalítica, tem propiciado avanços significativos no estudo de aspectos associados à biologia, bioquímica, características antigênicas e moleculares, que podem estar diretamente envolvidos na relação parasita-hospedeiro. Há cerca de duas décadas, essas enzimas têm despertado o interesse científico, em particular, as proteases ligadas à membrana plasmática e aquelas excretadas e/ou secretadas pelo parasita.

Giardia duodenalis, assim como outros protozoários parasitas, apresenta intensa atividade proteolítica, entretanto, relativamente pouco se conhece sobre a participação de suas proteases no desenvolvimento, patogenia e metabolismo desse protozoário. O fato de que enzimas proteolíticas presentes em trofozoítos de *Giardia* sejam liberadas como produtos de excreção/secreção assume importância especial, quando se considera a possibilidade de que essas proteases possam ser responsáveis por alterações na superfície da mucosa intestinal durante a infecção.

Até o presente, ainda são escassos os estudos de caracterização bioquímica, sobretudo, os que se propõem a investigar a atividade de proteases em trofozoítos de cepas de *Giardia* isoladas e axenizadas em nosso meio. Por tudo isso, o presente trabalho constitui uma primeira iniciativa para se identificar e caracterizar bioquimicamente os produtos de excreção/secreção

de trofozoítos de cepa isolada e axenizada no Brasil (BTU-11), tendo por referência a cepa Portland 1.

Em análise eletroforética, por SDS-PAGE, o perfil das proteínas presentes nos PE/S de trofozoítos revelou padrões distintos quanto ao número de bandas visualizadas. Nos PE/S da cepa BTU-11, foi possível distinguir apenas quatro bandas com massas moleculares aparentes de 110, 69, 55 e 28 kDa, enquanto que no perfil da cepa P-1, foram identificadas seis bandas de proteínas distribuídas na faixa de 123 a 28 kDa e com as seguintes massas moleculares: 123, 110, 81, 69, 55 e 28 kDa.

Hoje, sabe-se que os trofozoítos de *Giardia* consistem em um mosaico complexo de proteínas, sendo que algumas dessas moléculas já foram identificadas e caracterizadas, como por exemplo, as giardinas, as proteínas ricas em cisteína, as proteínas do citoesqueleto e as proteínas solúveis de alto peso molecular[47,48]. Entretanto, ainda são escassas as informações sobre a atividade dessas e de outras proteínas como produtos de excreção/secreção.

Entre as primeiras caracterizações bioquímicas dos PE/S de *Giardia*, destaca-se o estudo realizado por NASH et al.[36] que utilizando a marcação da membrana de trofozoítos das cepas-padrão WB e Portland 1, com iodo radioativo, revelaram, nos perfis eletroforéticos, uma banda marcante e dispersa na faixa de 94-225 kDa. Em estudos posteriores, KAUR et al.[16,34], empregando PE/S da cepa P-1, purificaram e caracterizaram como importante imunógeno, uma proteína de superfície de aproximadamente 58 kDa. Mais recentemente, JIMÉNEZ et al.[35], também analisando os PE/S da cepa P-1, demonstraram um perfil de proteínas complexo, no qual, pelo menos 10-11

bandas com massas moleculares variando de 153 a 15 kDa foram identificadas. Apesar dessas observações, esses mesmos autores não relacionam os pesos moleculares correspondentes a cada uma das 11 bandas identificadas no perfil eletroforético. Mais recentemente, JIMÉNEZ et al.[49], em estudo realizado para identificar glicoproteínas presentes no PE/S da cepa P-1, apresentam o perfil protéico e fazem referência à observação de proteínas com massas moleculares de aproximadamente 120, 103, 61, 58, 50, 40, 36, 25, 17 e 15 kDa. Não obstante às diferenças quanto à complexidade do perfil protéico, as proteínas detectadas em nosso estudo apresentaram massas moleculares muito próximas àquelas reportadas por esses autores.

Vale comentar que no presente estudo, empregando a mesma metodologia adotada por JIMÉNEZ et al.[26,35] para a obtenção dos PE/S, os nossos resultados, no que se refere à análise eletroforética da cepa P-1, não confirmam as observações feitas por esses pesquisadores. Ao contrário desses autores que identificaram 10-11 bandas de proteínas, de acordo com os nossos resultados, o perfil eletroforético revelou um padrão simples e composto por apenas seis bandas. Na tentativa de interpretar as diferenças entre os resultados obtidos nessas duas investigações, alguns aspectos relacionados às pequenas modificações efetuadas no protocolo para a obtenção dos PE/S e para o fracionamento eletroforético das proteínas poderiam ser considerados. Dessa forma, diferenças quanto às condições de execução da técnica de SDS-PAGE, incluindo variações na concentração do gel, na concentração das proteínas da amostra a ser fracionada, nas condições da corrida eletroforética e no tipo de coloração dos géis, devem ser consideradas. Além das diferenças

metodológicas, é importante considerar que, mesmo em condições que garantam a maior estabilidade das proteínas, elas são frágeis e suscetíveis às mudanças físico-químicas, o que muitas vezes, torna imprevisível o comportamento dessas moléculas no decorrer dos processos de caracterização bioquímica.

Além da diferença mencionada anteriormente, o perfil dos PE/S da cepa BTU-11 apresentou menor número de bandas de proteínas em comparação com a cepa P-1. Sendo assim, nos PE/S da cepa autóctone foi possível distinguir apenas quatro bandas com massas moleculares aparentes de 110, 69, 55 e 28 kDa. Já no perfil da cepa P-1, foram identificadas seis bandas de proteínas com as seguintes massas moleculares: 123, 110, 81, 69, 55 e 28 kDa. Essa situação poderia sugerir a ocorrência de diferenças quantitativas em relação à concentração de certas proteínas presentes nas preparações das cepas analisadas.

É fato que muitas proteínas dos parasitas, inclusive *Giardia*, apresentam atividade enzimática, o que as tornam importantes, especialmente, no que se refere aos mecanismos patogênicos e aos eventos de diferenciação desses organismos. Correntemente, na maioria dos estudos, as enzimas de interesse estão presentes em preparações complexas, cuja composição não é bem conhecida. Nesse caso, a atividade proteolítica tem sido avaliada em ensaios que empregam substratos naturais, que por serem proteínas que apresentam várias ligações peptídicas, possibilitam o reconhecimento de uma grande diversidade de proteases. Além disso, vale destacar que, o estudo de proteases que ainda não são bem conhecidas inclui caracterizar a composição

das moléculas quanto à atividade enzimática e ao peso molecular. Entre as alternativas metodológicas disponíveis, a eletroforese em gel de poliacrilamida é considerada uma das técnicas bioquímicas mais adequadas para este propósito.

Considerando que, proteases excretadas e secretadas *in vitro* por trofozoítos de cepas axenizadas em nosso meio ainda não foram caracterizadas, a atividade enzimática dos PE/S foi avaliada qualitativamente em géis copolimerizados com gelatina e colágeno e em ensaios empregando hemoglobina humana.

Os nossos resultados revelaram degradação da gelatina pelos PE/S e padrões de hidrólise similares nas duas cepas. A atividade gelatinolítica foi detectada na faixa de 77 a 18 kDa, destacando-se as bandas de aproximadamente 77, 66, 54 e 52 kDa. Além dessas zonas de hidrólise, duas bandas se destacam nas faixas de 21 e 18 kDa.

A despeito do interesse de vários pesquisadores em investigar as proteases de *Giardia*, até o presente, apenas três publicações disponíveis na literatura referem-se à caracterização de proteases presentes em sobrenadante de culturas de trofozoítos[26,35,50]. As observações feitas no presente estudo corroboram com essas investigações que constatam a presença de enzimas proteolíticas nos PE/S de trofozoítos de *Giardia* e demonstram a atividade das proteases em géis copolimerizados com gelatina.

Entre as principais bandas de hidrólise detectadas em nosso estudo, algumas apresentam massas moleculares próximas a de proteases demonstradas por esses investigadores. Em PE/S da cepa P-1, JIMÉNEZ et al.

[26,35] demonstraram como zonas de hidrólise mais evidentes as bandas de 175, 103, 83, 72, 63, 59, 36, 17 e 15 kDa. Avaliando a atividade de proteases em PE/S de trofozoítos da cepa-padrão WB, RODRÍGUEZ-FUENTES et al.[50] detectaram sete bandas de proteólise com massas moleculares de 198, 135, 120, 107, 73, 30 e 22 kDa.

Ao contrário do que foi observado por esses autores, no presente trabalho, o padrão de atividade das proteases dos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 não revelou atividade gelatinolítica associada à presença de bandas de hidrólise de alto peso molecular. Vale comentar que, diferenças verificadas entre os perfis de hidrólise apresentados em diferentes estudos podem estar associadas às alterações metodológicas efetuadas nos protocolos para a obtenção dos PE/S e para o fracionamento eletroforético das proteases. Além disso, a despeito da gelatina ter sido o substrato avaliado nesses estudos, a habilidade de muitas proteases manterem-se ativas pode ser influenciada por variações do tampão empregado para a ativação das enzimas, principalmente quanto ao pH da solução. Dessa forma, ao confrontar os resultados obtidos em diferentes estudos, é conveniente considerar dois aspectos importantes: (1) as proteases, como proteínas que são, também sofrem mudanças físico-químicas que podem determinar a alteração ou a completa perda da atividade e (2) sob certas condições, técnicas que são empregadas para o mesmo fim, podem conduzir a resultados diferentes.

Com relação à degradação do colágeno tipo I por proteases dos PE/S, algumas bandas puderam ser detectadas no perfil de hidrólise deste substrato. O padrão de degradação para as cepas BTU-11 e P-1 foi similar, podendo ser

distinguidas áreas de hidrólise na região variando de 145 a 18 kDa, destacando-se a zona de proteólise de 145 a 82 kDa.

A atividade de proteases de parasitas sobre o colágeno já foi avaliada em ensaios para a caracterização de enzimas de algumas espécies de parasitas, como *Trypanosoma cruzi*[51], *Trichomonas vaginalis*[52], *Trichomonas tenax*[53], *Entamoeba histolytica*[54], *Acanthamoeba* spp[45], *Naegleria* fowleri[55], *Balamuthia mandrilaris*[56] e *Onchocerca volvulus*[57]. Nas infecções por amebas patogênicas, como por exemplo, *E. histolytica* e *Acanthamoeba* spp, as proteases extracelulares têm sido consideradas como importantes fatores de virulência, uma vez que essas enzimas são capazes de degradar componentes importantes da matriz extracelular, permitindo assim a invasão dos tecidos pelo parasita.

No que se refere à atividade colagenolítica de proteases de trofozoítos de *Giardia*, ainda são restritas as informações disponíveis na literatura. Até o momento, somente WILLIAMS & COOMBS[25] e CORADI & GUIMARÃES[28] relatam a degradação de colágeno por enzimas proteolíticas presentes em lisados de trofozoítos. Sendo assim, o presente trabalho consiste na primeira caracterização da atividade proteolítica de PE/S de *Giardia* sobre o colágeno.

Vale ressaltar que, o colágeno é um componente primário da matriz extracelular de diferentes tecidos, onde em associação com glicoproteínas e proteoglicanos forma uma rede complexa, capaz de preservar a integridade dos tecidos. Os tecidos conectivos e membranas basais representam importantes barreiras a serem transpostas pelos parasitas nos processos de invasão, disseminação e obtenção de nutrientes. Dessa forma, a produção de

substâncias capazes de promover a degradação dos elementos estruturais da matriz extracelular podem ser cruciais para a sobrevivência desses organismos.

No epitélio do intestino delgado, o colágeno é uma das principais proteínas estruturais que compõem esse tecido. A habilidade dos PE/S de *Giardia* promoverem *in vitro* a hidrólise dessa proteína pode sugerir que a atividade de proteases excretadas e/ou secretadas pelos trofozoítos possa estar envolvida na degradação de componentes da matriz extracelular do intestino delgado do hospedeiro. Além disso, as evidências de que os PE/S atuem como toxinas sobre a mucosa do intestino delgado do hospedeiro, alterando as vilosidades, reforçam essas especulações.

Além das atividades gelatinolítica e colagenolítica dos PE/S de trofozoítos de *G. duodenalis*, nossos resultados revelaram também, a degradação de outro substrato protéico, a hemoglobina. Diferentemente dos ensaios que incorporaram a gelatina e o colágeno ao gel de poliacrilamida, para a análise da proteólise da hemoglobina, cada PE/S foi incubado com o substrato e os produtos de degradação foram visualizados em géis SDS-PAGE. A escolha desse procedimento baseou-se em informações reunidas em uma investigação anterior, quando, empregando lisados de trofozoítos, observou-se que nos ensaios que incorporam hemoglobina ao gel, as corridas eletroforéticas requerem a aplicação de amostras com maior concentração de proteínas[28]. Em relação aos PE/S, isso se torna um fator limitante, pois o rendimento protéico dessas preparações, geralmente é muito baixo. Dessa

forma, o emprego de baixas concentrações de proteínas pode reduzir a sensibilidade do procedimento e interferir nos resultados dos ensaios.

No presente estudo, as observações feitas nos ensaios com hemoglobina demonstraram que proteínas presentes nos PE/S das cepas BTU-11 e P-1 apresentam atividade proteolítica sobre esse substrato. Em 1989, HARE et al.[58] e PARENTI[59] em dois estudos diferentes, empregando ensaios que quantificam a proteólise de hemoglobina, demonstraram a hidrólise deste substrato por enzimas presentes em lisados da cepa P-1. A despeito dessas observações, os autores não discutem a relevância fisiológica da degradação de hemoglobina por proteases produzidas por trofozoítos de *Giardia*.

Mais recentemente, CORADI & GUIMARÃES[28], estudando as proteases presentes nos lisados de cinco cepas autóctones e da cepa P-1, relatam a atividade de hemoglobinases em géis copolimerizados com o substrato. Além disso, nesse estudo, os autores especulam, à luz das informações reunidas em estudos com protozoários bioquimicamente semelhantes à *Giardia*, sobre a possível participação dessas proteases em processos fisiológicos do parasita. Segundo esses autores, considerando que o ferro é um importante fator de crescimento e que, a hemoglobina consiste em potencial fonte deste elemento, a degradação enzimática dessa proteína seria um mecanismo importante para a obtenção de ferro. Em relação à *Giardia*, sabe-se que o ferro é elemento essencial para a sua biologia, o que pode ser enfatizado pelo fato de que o meio de cultura para a manutenção *in vitro* dos trofozoítos deve ser suplementado com este elemento.

O estudo bioquímico das proteases envolve, além da análise da atividade sobre diferentes substratos, a caracterização das enzimas quanto à classe a que pertencem. Para isso, avalia-se o efeito de inibidores sintéticos de cisteína, serina, metalo e aspartil-proteases. As cisteína-proteases têm sido identificadas como as principais enzimas presentes em trofozoítos de *G. duodenalis*[25,26,27,28,29,30,35]. Essas enzimas representam também, a classe de proteases mais abundante em outros protozoários parasitas[22].

De acordo com as nossas observações, nos ensaios em que se empregaram a gelatina e o colágeno como substratos, a atividade proteolítica dos PE/S de trofozoítos foi marcantemente inibida por E-64, inibidor específico e irreversível da atividade de cisteína-proteases. Além dessa substância, a iodacetamida (IAA), outro inibidor de cisteína-proteases, promoveu forte inibição da degradação desses substratos. Esta observação é corroborada pelos resultados reportados em outras investigações que indicam o predomínio de cisteína-proteases em lisados[25,27,28] ou em PE/S de trofozoítos de *Giardia*[26,35,50]. Além da inibição pelas substâncias E-64 e IAA, nossos resultados demonstraram redução marcante da atividade proteolítica nos géis incubados com TPCK e TLCK, além de inibição total ou parcial nos géis incubados com leupeptina. Esses inibidores, apesar de atuarem sobre serina-proteases, podem inibir a atividade de algumas cisteína-proteases. Isso explicaria o efeito inibitório destas substâncias sobre a atividade da maioria das proteases presentes nos PE/S. Esse mesmo efeito já foi observado em estudos realizados com lisados de trofozoítos de *Giardia*[25,27,28]. Em relação aos ensaios com inibidores para serina (PMSF e DCI), metalo-proteases (fenantrolina e

EDTA) e aspartil-proteases (pepstatina), nenhuma dessas substâncias promoveu inibição da proteólise da gelatina e do colágeno. Apenas JIMÉNEZ et al.[26], empregando géis copolimerizados com gelatina e os inibidores EDTA e 1,10-fenantrolina, sugerem a presença de metalo-proteases nos PE/S da cepa P-1, ao observarem o efeito inibitório parcial da atividade de uma zona de hidrólise de 36 kDa.

Além desses inibidores, nos géis copolimerizados com gelatina, observou-se também, inibição parcial da proteólise pelo elastatinal, substância conhecida por inibir a atividade de serina-proteases. Esta observação é corroborada pelos resultados descritos por WILLIAMS & COOMBS[25], quando esses autores verificaram redução da atividade enzimática em lisados de trofozoítos de *Giardia*.

No que se refere à caracterização da atividade hemoglobinolítica dos PE/S, apenas TLCK, inibiu significativamente a degradação das cadeias monomérica e dimérica da hemoglobina. Essa substância tem efeito inibitório, especialmente, sobre a atividade de serina-proteases do tipo tripsina, embora possa promover a inibição da atividade de algumas cisteína-proteases. Diante dessa informação e ao se considerar que nas preparações de trofozoítos predominam as cisteína-proteases, seria pertinente sugerir que a degradação da hemoglobina pelos PE/S advém da atividade dessas enzimas. Entretanto, isso seria mais plausível se os inibidores E-64 e IAA não tivessem promovido uma inibição muito discreta da atividade sobre a hemoglobina. Recentemente, CORADI & GUIMARÃES[28], ao caracterizarem a atividade das proteases de

lisados de *Giardia* sobre a hemoglobina, verificaram que a lise do substrato foi marcantemente inibida pelo PMSF, um inibidor irreversível de serina-proteases.

O presente estudo revelou a presença de proteases em produtos de excreção/secreção de trofozoítos de cepa autóctone e da cepa referência P-1. Esses produtos demonstraram atividade sobre substratos protéicos como gelatina, colágeno e hemoglobina. Além disso, as observações feitas nos ensaios demonstraram o predomínio da atividade de cisteína-proteases sobre a degradação da gelatina e do colágeno, contudo na hidrólise da hemoglobina destacaram-se as serina-proteases. Essas observações reforçam o fato de que, muitas dessas enzimas diferem quanto à preferência por substratos protéicos, sendo a atividade das proteases, substrato-dependente. Segundo WILLIAMS & COOMBS[25], o efeito dos inibidores de proteases é substrato-dependente e pode variar em função da especificidade das enzimas pelo substrato, principalmente, em preparações protéicas mais complexas.

Mesmo diante da evidência da atividade de serina-proteases em PE/S de *Giardia*, ainda predominam nestas preparações as cisteína-proteases. Estudos para identificação e caracterização de mecanismos mediados por proteases em diferentes organismos têm revelado que nos protozoários parasitas, as cisteína-proteases, além de funções catabólicas gerais, estariam envolvidas em diferentes processos como invasão tissular e celular, morfogênese, virulência, patogenicidade e imuno-evasão[22].

Com relação às proteases de *Giardia*, especialmente, aquelas excretadas e/ou secretadas por trofozoítos, a caracterização dessas moléculas e a participação em mecanismos de interação com o hospedeiro ainda não são

uma questão finalizada, existindo mais hipóteses do que respostas concretas. Até o momento, muitas das informações sobre as proteases presentes em PE/S foram reunidas em estudos com outros protozoários parasitas como *Plasmodium* spp, *T. cruzi*, *Leishmania* spp, *E. histolytica*, *T. vaginalis* e *Acanthamoeba* spp.

Entre alguns dos mecanismos mediados por proteases presentes em PE/S de protozoários, destaca-se a participação dessas enzimas nos processos de reconhecimento e adesão do parasita às células do hospedeiro. Há evidências de que, nas infecções por *E. histolytica*[54] e *T. vaginalis*[60], protozoários bioquimicamente semelhantes à *Giardia*, a aderência dos trofozoítos às células dos epitélios intestinal e urogenital, respectivamente, esteja associada à presença de moléculas denominadas adesinas, entre as quais já foram identificadas algumas cisteína-proteases. Apesar de *Giardia* não ser um parasita invasivo, a aderência dos trofozoítos à mucosa do intestino delgado é condição essencial à sobrevivência do parasita e, conseqüentemente, ao estabelecimento da infecção. Essa aderência tem sido atribuída, principalmente, ao disco adesivo, por meio da combinação de forças mecânicas e hidrodinâmicas, às proteínas contráteis do citoesqueleto e às moléculas de lectinas[61]. Embora ainda não se conheçam detalhadamente os mecanismos de citoaderência de *Giardia*, há a possibilidade de que as cisteína-proteases presentes nos PE/S possam estar envolvidas nesse processo, à semelhança do que foi observado para *T. vaginalis*, um outro flagelado de mucosa, não invasivo. Ademais, são várias as evidências de que os trofozoítos

de *Giardia* produziriam substâncias tóxicas capazes de interagir diretamente com as células do epitélio intestinal[16,21].

As substâncias secretadas e excretadas pelos parasitas despertam considerável interesse dos pesquisadores, especialmente, quando se cogita a presumível liberação desses produtos *in vivo* e o envolvimento direto com componentes do hospedeiro. Ainda hoje, a detecção de proteólise em preparações obtidas de parasitas tem sido feita a partir de ensaios *in vitro*, e por isso, a interpretação dos resultados requer conhecimento básico para se evitar inferências indevidas. Assim, muitas vezes, a atividade das enzimas sobre substratos protéicos como colágeno, hemoglobina, entre outros, pode conduzir à idéia de que a degradação desses substratos ocorre *in vivo*, e de que seja fator importante na relação parasita-hospedeiro. Para confirmar essa possibilidade, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de que tais funções possam, realmente, ser atribuídas às enzimas dos parasitas em estudo.

Mesmo para parasitas intensamente investigados como *E. histolytica*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp e *Plasmodium* spp, os estudos de caracterização dos produtos de excreção/secreção ainda não responderam a todas as questões sobre o papel dessas substâncias. Considerando que ainda são poucos os trabalhos que caracterizam as proteases liberadas pelos trofozoítos de *Giardia* como produtos de excreção/secreção, os resultados deste estudo fornecem informações relevantes sobre essas moléculas. A despeito das evidências de que esses produtos possam participar da patogênese da giardíase, ainda são necessárias investigações mais aprofundadas, inclusive que requeiram a

purificação dessas enzimas. Somente assim, as informações reunidas poderão levar à melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na relação parasita-hospedeiro.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De acordo com as observações feitas no presente estudo pode-se concluir que:

1. As proteínas dos produtos de excreção/secreção (PE/S) de trofozoítos das cepas BTU-11 e P-1 apresentam padrões eletroforéticos simples e distintos quanto ao número de bandas visualizadas.

2. Diferentes proteases estão presentes nos PE/S da cepa autóctone BTU-11, à semelhança da cepa-padrão P-1.

3. Proteases presentes nos PE/S de trofozoítos são capazes de degradar substratos protéicos como gelatina, colágeno e hemoglobina.

4. A atividade gelatinolítica e colagenolítica dos PE/S está predominantemente associada às cisteína-proteases, entretanto, há evidências de serina-proteases.

5. A atividade de proteases do tipo serina é mais evidente na degradação da hemoglobina pelos PE/S.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS[2]

[2] Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. Rev Saude Publica 1999; 33: 6-15.

1. Thompson RCA, Lymbery AJ, Meloni BP. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: taxonomic and epidemiological significance. Protozool Abst 1990; 14: 1-28.

2. Kunstler J. Sur cinq protozoaries parasites nouveaus. C R Seances Soc Biol Fil 1882; 95: 347-9.

3. Stiles CW. Parasitological observations made in Orange County, Florida. Helminthol Soc Wash 1932; 19: 90.

4. Nash TE, Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. J Infect Dis 1985; 152: 1166-71.

5. Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ Calif Publ Zool 1952; 57: 53-146.

6. Erlandsen SL, Bemrick WJ. Sem evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J Parasitol 1987; 73: 623-9.

7. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, et al. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol 1990; 76: 717-24.

8. Feely DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. J Protozool 1988; 35: 52-4.

9. Van Keulen H, Feely D, Macechko P, Jarroll E, Erlandsen S. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol 1998; 84: 294-300.

10. Monis PT, Thompson RC. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? Infect Genet Evol 2003; 3: 233-44.

11. Guimarães S, Sogayar MI, Franco MF. *Giardia duodenalis*: inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. Rev Inst Med Trop São Paulo 1999; 41: 45-58.

12. WHO. The world health report 1996. Geneva: World Health Organization; 1996.

13. Flanagan PA. *Giardia* – diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. Epidemiol Infect 1992; 109: 1-22.

14. Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol 1993; 32: 71-160.

15. Farthing MJ, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. Am J Clin Nutr 1986; 43: 395-405.

16. Kaur H, Ghosh S, Samra H, Vinayak VK, Ganguly NK. Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. Parasitology 2001; 123: 347-56.

17. Buret A, Gall DG, Olson ME. Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. Parasitol Res 1991; 77: 109-14.

18. Singh KD, Bhasin DK, Rana SV, Vaiphei K, Katyal R, Vinayak VK, et al. Effect of *Giardia lamblia* on duodenal disaccharidase levels in humans. Trop Gastroenterol 2000; 21: 174-6.

19. Müller N, Von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. Int J Parasitol 2005; 35: 1339-47.

20. Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, et al. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut 2007; 56: 328-35.

21. Shant J, Bhattacharyya S, Ghosh S, Ganguly NK, Majumdar S. A potentially important excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. Exp Parasitol 2002; 102: 178-86.

22. Mckerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu Rev Microbiol 1993; 47: 821-53.

23. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 597-635.

24. Robertson CD, Irvine JW, Brown K, Jooma L, Seely C, Young CJ, et al. Proteinases of *Giardia lamblia* trophozoites. Trans R Soc Trop Hyg 1991; 85: 844.

25. Williams AG, Coombs GH. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. Int J Parasitol 1995; 25: 771-8.

26. Jiménez JC, Uzcanga G, Zambrano A, Di Prisco MC, Lynch NR. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. J Parasitol 2000; 86: 859-62.

27. Guimarães S, Sogayar MI, Franco MF. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 77-81.

28. Coradi ST, Guimarães S. *Giardia duodenalis*: protein substrates degradation by trophozoite proteases. Parasitol Res 2006; 99: 131-6.

29. Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, Mckerrow JH. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. Cell 1997; 89: 437-44.

30. Touz MC, Nores MJ, Slavin I, Carmona C, Conrad JT, Mowatt MR, et al. The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote. J Biol Chem 2002; 277: 8474-81.

31. Alp MH, Hislop IG. The effect of *Giardia lamblia* infestation on the gastrointestinal tract. Australas Ann Med 1969; 18: 232-7.

32. Meyer EA, Radulescu S. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol 1979; 7: 1-47.

33. Katelaris PH, Sidhu GS, Oakenfull DG, Nug MC. Pathogenesis of diarrhoea caused *Giardia lamblia*: evidence of an exotoxin. J Gastroenterol Hepatol 1988; 3: A4.

34. Kaur H, Samra H, Ghosh S, Vinayak VK, Ganguly NK. Immune effector responses to an excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. Immunol Med Microbiol 1999; 23: 93-105.

35. Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 152-60.

36. Nash TE, Gillin FD, Smith PD. Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*. J Immunol 1983; 131: 2004-10.

37. Rocha MO, Toledo VPPCP, Mello RT, Moraes-Santos T, Costa CA, Guimarães TM, et al. *Giardia lamblia*: isolation, axenization and characterization of a strain from an asymptomatic patient from Belo Horizonte, MG, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90: 43-4.

38. Guimarães S, Sogayar MI, Franco M. Analysis of proteins from membrane and soluble fractions of *Giardia duodenalis* trophozoites of two Brazilian axenic strains. Rev Inst Med Trop São Paulo 2002; 44: 239-44.

39. David EB, Guimarães S, Ribolla PE, Coradi ST, Alonso DP. Partial characterization of proteolytic activity in *Giardia duodenalis* purified proteins. Rev Inst Med Trop São Paulo 2007; 49: 385-8.

40. Meyer EA. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. Exp Parasitol 1976; 39: 101-5.

41. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77: 487-8.

42. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5.

43. Wray W, Boulikas T, Wray VP, Kancol JR. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1981; 118: 197-203.

44. Bonaldo MC, d' Escoffier LN, Salles JM, Goldenberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Exp Parasitol 1991; 73: 44-51.

45. Kim HK, Ha YR, Yu HS, Kong HH, Chung DII. Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. Korean J Parasitol 2003; 41: 189-96.

46. Beynon RJ, Bond JS. Proteolytic enzymes. Oxford: Oxford University Press; 1989.

47. Char S, Shetty N, Narasimha M, Elliott E, Macaden R, Farthing MJG. Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57 kDa antigen. Parasite Immunol 1991; 13: 329-37.

48. Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol Today 2000; 16: 210-3.

49. Jiménez JC, Morelle W, Michalsky JC, Dei-Cas E. Excreted/secreted glycoproteins of *G. intestinalis* play an essential role in the antibody response. Parasitol Res 2007; 100: 715-20.

50. Rodríguez-Fuentes GB, Cedillo-Rivera R, Fonseca-Liñán R, Arguello-García R, Muñoz O, Ortega-Pierres G, et al. *Giardia duodenalis*: analysis

of secreted proteases upon trophozoite-epithelial cell interaction in vitro. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 693-6.

51. Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. Biochem J 1997; 324: 129-37.

52. Mendonza-López MR, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Avila-Gonzalez L, Ruíz-Tachiquín ME, Ortega-Lopez J, et al. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Infect Immun 2000; 68: 4907-12.

53. Yamamoto A, Asaga E, Nagao E, Igarashi T, Goto N. Characterization of the cathepsin B-like proteinases of *Trichomonas tenax* ATCC 30207. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 360-4.

54. Que X, Reed SL. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. Parasitol Today 1997; 13: 190-4.

55. Serrano-Luna J, Cervantes-Sandoval I, Tsutsumi V, Shibayama M. A biochemical comparison of proteases from pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria gruberi*. J Eukaryot Microbiol 2007; 54: 411-7.

56. Matin A, Stins M, Kim KS, Khan NA. *Balamuthia mandrillaris* exhibits metalloprotease activities. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 47: 83-91.

57. Haffner A, Guilavogui AZ, Tischendorf FW, Brattig NW. *Onchocerca volvulus*: microfilariae secrete elastinolytic and males nonelastinolytic matrix-degrading serine and metalloproteases. Exp Parasitol 1998; 90: 26-33.

58. Hare DF, Jarroll EL, Lindmark DG. *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. Exp Parasitol 1989; 68: 168-75.

59. Parenti DM. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. J Infect Dis 1989; 160: 1076-80.

60. Lehker MW, Sweeney D. *Trichomonas* invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. Sex Transm Infect 1999; 75: 231-8.

61. Inge PMG, Edson CM, Farthing MJG. Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. Gut 1988, 29: 795-801.

RESUMO

8. RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de identificar e caracterizar os produtos de excreção/ secreção (PE/S) de trofozoítos de *Giardia duodenalis* de uma cepa axênica isolada no Brasil (BTU-11), tendo por

referência a cepa padrão Portland 1 (P-1) isolada nos Estados Unidos. Os PE/S foram obtidos a partir dos sobrenadantes de cultura de trofozoítos mantidos em meio RPMI por 6 horas a 37°C. Os PE/S de cada cepa foram analisados quanto ao perfil eletroforético em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a atividade proteolítica foi avaliada em géis contendo gelatina e colágeno tipo I a 0,2% e em ensaios empregando hemoglobina a 0,1%. A caracterização das proteases dos PE/S foi realizada em ensaios para avaliar o efeito de inibidores sintéticos de cisteína, serina, metalo e aspartil proteases sobre a degradação de cada substrato testado. A análise dos perfis protéicos revelou padrões simples, porém distintos quanto ao número de bandas de proteínas, visualizando nos PE/S das cepas P-1 e BTU-11, respectivamente, seis e quatro bandas com massas moleculares distribuídas na faixa de 123 a 28 kDa. Quanto à atividade proteolítica, todos os substratos foram degradados por enzimas presentes nos PE/S. A atividade gelatinolítica foi observada na faixa de 77 a 18 kDa, destacando-se seis bandas evidentes de aproximadamente 77, 66, 54, 52, 21 e 18 kDa. A degradação do colágeno foi detectada na faixa de 145 a 18 kDa, sendo que as zonas de proteólise de maior evidência foram observadas nas faixas de 145 a 82 kDa e de 56 a 34 kDa, onde destacam-se as bandas de 145, 96, 82 e 34 kDa. A análise dos padrões de hidrólise da hemoglobina demonstrou similaridade entre as cepas e revelou degradação total da cadeia dimérica e lise parcial da cadeia monomérica. A atividade gelatinolítica e colagenolítica dos PE/S foi marcantemente bloqueada por inibidores de cisteína-proteases, sugerindo o predomínio dessas enzimas, embora haja a evidência da atividade de algumas

serina-proteases. Quanto à degradação da hemoglobina, a atividade de proteases do tipo serina foi mais evidente nos ensaios com esse substrato. Considerando que ainda são poucos os estudos que caracterizam os produtos de excreção/secreção de trofozoítos de *Giardia*, os resultados da presente investigação fornecem informações relevantes sobre essas moléculas, que, provavelmente, podem estar envolvidas na relação parasita-hospedeiro.

ABSTRACT

9. ABSTRACT

The present investigation was undertaken to examine the protease activity in excretory/secretory (E/S) products of *Giardia duodenalis* trophozoites of an axenic Brazilian strain (BTU-11) and the reference strain Portland 1 (P1).

E/S products in conditioned medium by trophozoites of each strain were tested in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for the protein profiles, and the proteases activity was analyzed using substrate gelatin and collagen impregnated SDS-PAGE and haemoglobin assay. The proteases characterization was based on inhibition assays including synthetic inhibitors for cysteine, serine, metallo and aspartic proteases. Electrophoresis analysis of E/S products revealed a banding pattern composed by few bands (4-6 bands) in the migration region of 123 to 28 kDa. Proteolytic products were detected in the conditioned medium by trophozoites of both assayed strains. In the gels containing copolymerized gelatin and collagen, E/S products promoted degradation of both substrates and the most evident proteolysis zones were distributed in the migration regions of 77 to 18 kDa and 145 to 18 kDa, respectively, in the patterns of gelatinolytic and collagenolytic activities. Degradation of haemoglobin was also observed, and the pattern of hydrolysis was similar in both E/S products assayed. Inhibiton assays showed that the main proteolytic activity in E/S products is due to cysteine proteases although the presence of serine proteases was also indicated, mainly in the hydrolysis of haemoglobin. These observations are relevants, especially if we consider that products released by *Giardia* trophozoites may be implicated in host-parasite relationship.

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