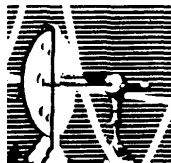


Joana Bittencourt Silvestre

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E
REGULATÓRIOS DO ENCISTAMENTO DE
Giardia lamblia

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
2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Joana Bittencourt Silvestre

Aspectos morfológicos e regulatórios do encistamento de *Giardia lamblia*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador:
Wanderley de Souza

Rio de Janeiro
2007.

Bittencourt-Silvestre, Joana

Aspectos morfológicos e regulatórios do encistamento de *Giardia lamblia*. Rio de Janeiro, 2007.

X, 76f: il

Dissertação de Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2007.

Orientador: Wanderley de Souza

1. Giardia . 2. Encistamento 3. Sinalização 4. Microscopia Eletrônica
Universidade Federal do Rio de Janeiro. I. Título

Aos meus pais Mona e Edmir,
Às minha avós, Alaíde e Maria de Lourdes (*in memorian*)
Aos amigos (inclusive caninos)
Ao Leandro, querido

Agradecimentos

Obrigada Edmir e Mona, meus queridos pais, que mais do que me amaram, dedicaram-se para que eu fosse feliz. Todas as minhas conquistas serão também suas.

D. Alaíde e D. Lourdes, obrigada pelo carinho que só as avós podem dar. Cada uma com um jeito particular de me fazer sentir especial.

À minha família, que sempre teve orgulho de mim e sempre mostrou, muito obrigada.

Leandro, obrigada por tudo. Soubemos combinar vida pessoal e profissional de um jeito especial. Você me ajudou e me apoiou em todos os momentos. Você é minha melhor dupla!

Agradeço ao Prof. Wanderley, por ter me aceitado como aluna, e por me deixar aprender tantas coisas com seus anos de sabedoria.

Agradeço ao Bosco e à Nete, que sempre fizeram com que meu trabalho fosse mais fácil e prazeroso.

Agradeço à Ana, Noêmia, Dedá e Cazuza. Vocês sempre quebraram meus galhos e me ajudaram em tudo que puderam. Obrigada!

Obrigada à professora Rossiane, quem eu admiro como excelente cientista e pessoa. Você foi mais que uma conselheira científica, foi amiga.

Obrigada à professora Narcisa. Você me ensinou muito e me ajudou a achar o caminho, quando estava muito perdida.

Obrigada à professora Márcia, quem eu admiro pelas idéias criativas e divertidas.

Agradeço à professora Cristina pelo incentivo e ótimas conversas, à professora Tecia pelos inúmeros ensinamentos, às professoras Sônia e Thaís por estarem sempre dispostas a ajudar, e ao mais novo professor, Kildare, por ótimas dicas e muita simpatia.

Adriana, minha primeira orientadora, obrigada por me apresentar o mundo da Giardia.

Agradeço à Loraine, que sempre foi professora para mim. Apreendi muito com você.

Letícia e Claudinha, companheiras giardólogas, obrigada pelo apoio constante e por mil favores com meios de cultura, soro, repiques e tudo o que puderam.

Celso, obrigada por tirar sempre minhas dúvidas, e me ensinar tantas coisas.

Às amigas mais que queridas, obrigada. Sarah, amiga de todas as horas, adoooooro você!!! (=). Érica, em cuja eficiência eu me espelho, e que também curte uma boa praia e uma festa. Débora, uma amiga e cientista nota 10. Te admiro muito e

fico muito feliz de ser sua vizinha de lab e de casa. Miria, quem admiro muito como cientista e pessoa. Emile, com que divido os dramas e percalços do mestrado, mas também muitas coisas boas.

Aos amigos queridos, obrigada. Juju, uma cientista de primeira qualidade. Gustavo, uma pessoa mais do que boa, sempre disposto a ajudar. Lia, que entrou e logo virou amiga! Dani, que sempre admirei pela alegria contagiante. Bel! Muito querida! Bruno Azevedo, pelas boas festas e ajuda científica. Dani C, obrigada pelo companheirismo, muitas caronas e, quem sabe um dia, croissant de chocolate...

Agradeço a amizade dos antigos membros do lab, que estiveram presentes em boa parte dos anos que estive lá: Mari fof's, Bruno, Marina, Juliana Dutra, Ana Cláudia.

Alunos do laboratório Hertha Meyer: Karlinha, Gisele, Tati (o trio superfofo), Mari Hammes, Marcel, Lúcio, Iamara, Allan, Paulo, Thiago Manchester, Carol, Julio, Thiago Luís, Juliana Vidal, Mari Garcia, Renata Brum, Renata Travassos, Thaisinha e a mais nova giardóloga, Karina. Vocês fazem meus dias melhores.

A todos os membros do Hertha Meyer, obrigada!

Obrigada Lorian, amigo de tantos anos e épocas: CAp, Licenciatura, Lab... Companheiros biólogos, vocês são muito queridos: Fernanda, Leo, Alexandre e Fabi. Amigos tamanduás, vocês sempre fizeram com que eu me sentisse melhor com a vida e comigo mesma. Muito obrigada queridos: Lelét, Ju, Tam, Cris, Julia, Manu, Carla, Nat, Foca, Dudu, Pedro, Camelo, Bruno e seus (caros) respectivos.

Marcelo, você sempre me diverte e me conforta. Quando se faz mestrado, essa é uma felicidade impagável. Gab, obrigada por não desistir de me convidar! E, diversão garantida na festa, Tati.... escolheu bem sua companhia =)

“Even diamonds start as coal”
Jose Antonio Pasillas II, Incubus

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HISTÓRICO E NOMENCLATURA	12
1.2 CLASSIFICAÇÃO	12
1.3 O CARÁTER PRIMITIVO	12
1.4 CICLO DE VIDA	14
1.5 O TROFOZOÍTA	14
1.6 O CISTO	19
1.7 O ENCISTAMENTO	19
1.8 INIBIDORES DO ENCISTAMENTO	21
1.9 SINALIZAÇÃO	21
1.9.1 Proteínas quinases e fosfatases	21
1.9.2 A via da proteína quinase C	22
1.9.3 A via da tirosina quinase	23
1.9.4 A via da PI3K	24
1.10 PROTEASSOMAS E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS	25
2 RACIONAL	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVOS GERAIS	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 CULTIVO	29
4.2 ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO	29
4.3 TESTE DE INIBIÇÃO DO ENCISTAMENTO	29
4.4 TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO	30
4.5 MICROSCOPIA ÓTICA	30
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	30
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	31
4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	31
4.9 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	31
4.10 ENSAIO DE ENDOCITOSE	31
4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA	32
5 RESULTADOS	33
5.1 INIBIÇÃO DO ENCISTAMENTO DE <i>G. lamblia</i>	33
5.1.1 Inibidores de quinases	33
5.1.2 Inibidores de fosfatases	35
5.1.3 Inibidor de proteassoma	36
5.2 ADIÇÃO DE INIBIDORES DE QUINASES EM DIFERENTES TEMPOS APÓS O ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO	36
5.3 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>G. lamblia</i>	37
5.4 MUDANÇA DE EXPRESSÃO DE CWP-2 APÓS TRATAMENTO COM LY294002 E GENISTEÍNA	38
5.5 DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA DE PAREDE CÍSTICA 2 NO ENCISTAMENTO	40
5.6 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DO ENCISTAMENTO DE <i>G. lamblia</i>	44
5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO EFEITO DOS INIBIDORES EFEIVOS DO ENCISTAMENTO	48
5.7.1 Microscopia ótica	48

5.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão	48
5.7.2.1 <i>Genisteína</i>	48
5.7.2.2 <i>LY294002</i>	49
5.8 EFEITO DO INIBIDOR DE PI3K NA CAPACIDADE ENDOCÍTICA DE <i>Giardia lamblia</i>	49
6. DISCUSSÃO	58
6.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO	58
6.2 AÇÃO DE INIBIDORES SOBRE O ENCISTAMENTO	58
6.3 ADIÇÃO DOS INIBIDORES EM DIFERENTES TEMPOS APÓS O ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO	61
6.4 PRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE CWP2 EM PARASITAS TRATADOS COM GENISTEÍNA E LY294002 NO MOMENTO DO ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO	62
6.5 MORFOLOGIA DO ENCISTAMENTO	62
6.6 LY294002 E GENISTEÍNA DESORGANIZAM ESTRUTURAS INTERNAS DE PARASITAS EM ENCISTAMENTO	63
6.7 ENDOCITOSE DE PARASITAS TRATADOS COM LY294002	64
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS	66

LISTA DE ABREVIACÕES

CWP – proteína de parede cística
CWP1 – proteína de parede cística 1
CWP2 – proteína de parede cística 2
DMSO – dimetil sulfoxido de sódio
VP – vesículas periféricas
VEEs – vesículas específicas de encistamento
PBS – solução salina tamponada com fosfato
 μM – micro molar
 μM – micrômetro
PI3K – fosfatidilinositol – 3 – quinase
TK – tirosina quinase
PKC – proteína quinase C

RESUMO

Giardia lamblia é um protozoário cosmopolita e parasita do intestino delgado de mamíferos. Possui duas formas em seu ciclo de vida. O trofozoíta coloniza o hospedeiro e o cisto é a forma infectiva e resistente eliminada nas fezes. A transformação do trofozoíta em cisto é extremamente importante para a manutenção da doença. Apesar de muito estudados, os mecanismos regulatórios deste processo não estão bem elucidados. Para investigar quais moléculas sinalizadoras teriam um papel neste processo foram feitas diversas avaliações da taxa de diferenciação de parasitas induzidos ao encistamento na presença de diversas drogas, tais como clastolactacistina- β -lactona (inibidor de proteassomas), ácido okadaico (inibidor de ser/tre fosfatases), Wortmanina (inibidor de PI3K), LY294002 (inibidor de PI3K), Genisteína (inibidor de tirosina quinase) e Staurosporina (inibidor de PKC). Foi observado que Genisteína 50 μ M e LY294002 10 μ M tiveram efeito inibitório significativo (79,2% e 85,9% respectivamente). O LY294002 mostrou-se eficiente também na inibição do crescimento de *G. lamblia*. A Genisteína inibiu a produção de proteína de parede cística 2 (CWP2) e nenhum dos inibidores pareceu modificar a distribuição desta proteína no parasita em encistamento. Quando a adição de Genisteína foi feita 6 ou 18 horas após o estímulo ao encistamento os efeitos inibitórios não foram tão evidentes (60,3% e 55,3%), contudo a adição de LY294002 após 6 horas de encistamento provocou a maior redução nas taxas de diferenciação (97,5%). Microscopia eletrônica de varredura demonstrou que, durante o encistamento, a entrada dos flagelos do trofozoíta ocorre dorsalmente e há um flagelo remanescente coberto por material fibrilar e proteínas de parede cística. Os inibidores de PI3K e tirosina quinase provocaram intensas mudanças na morfologia do trofozoíta inclusive desorganizações do citoesqueleto e de membranas internas, dando origem a figuras de membranas concêntricas. O LY294002 provocou uma dramática desorganização das vesículas periféricas, contudo isto não parece afetar a endocitose do parasita, visto pela incubação com Lúcido Yellow.

ABSTRACT

Giardia lamblia is a cosmopolitan protozoon parasite, which inhabits the upper small intestine of mammals. Its life cycle comprises two forms. The trophozoite colonizes the host and the cyst is the infective form released in the feces. The transformation of trophozoite into cyst is very important to the maintenance of the disease. Although very studied, the regulatory mechanisms of this process are still not clearly elucidated. To investigate which signaling molecules would participate in this process, we made many evaluations on the encystation ratio after treatment with clastolactacistin- β -lactone (proteasome inhibitor), okadaic acid (ser/thr phosphatase inhibitor), Wortmannin (PI3K inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor), Genistein (tyrosine kinase inhibitor) and Staurosporin (PKC inhibitor). 50 μ M Genistein and 10 μ M LY294002 treatment resulted in a significative decrease in encystation ratio (79,2% and 85,9% respectively). LY294002 also inhibited trophozoite growth. Genistein inhibited cyst wall protein 2 (CWP2) production and neither inhibitor seemed to modify the distribution of this protein during the encystation. When Genistein was added 6 or 18 hours post encystation stimuli, the inhibitory effect was not so remarkable (60,3% and 55,3%). Nevertheless, the addition of LY294002 after 6 hour of stimuli resulted in greater reduction of encystation rates (97,5%). Scanning electron microscopy showed that during encystation the flagella entry is dorsal and the reminiscent flagellum is covered with fibrillar material and cyst wall protein. PI3k and tyrosine kinase inhibitors treatment resulted in expressive changes in the parasite morphology, including cytoskeleton and internal membranes disorganization, giving origin to concentric membrane figures. The LY294002 treatment resulted in dramatic changes in the peripheral vesicles organization. However it does not seem to impair parasite endocytosis, as observed with Lucifer Yellow incubation

1.INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO E NOMENCLATURA

Giardia lamblia foi inicialmente descrita por Leeuwenhoek, em 1681, ao examinar suas próprias fezes em um microscópio ótico rudimentar. Em 1859, Lambl descreveu o parasita com mais detalhes, nomeando-o *Cercomonas intestinalis*. Em 1882 Kunstler propôs pela primeira vez “Giardia” como nome do gênero. Em 1888, Blanchard nomeou o organismo *Lambliia intestinalis*, e, em 1902, Stiles usou novamente o nome de gênero proposto por Lambl: *Giardia duodenalis*. A partir de então diversas mudanças de nome e agrupamentos em gênero e espécie aconteceram até que, em 1952, Filice propôs a nomenclatura e classificação em três espécies, de acordo com as características do corpo mediano: *Giardia lamblia*, *Giardia muris*, *Giardia agilis*. A primeira é encontrada no homem, cães e outros mamíferos. A segunda, em murinos e a terceira, em anfíbios. Na década de 80 o nome *Giardia duodenalis* foi muito utilizado, sendo substituído em frequência de uso nos anos 90 por *Giardia intestinalis*. Atualmente, a espécie é conhecida como *Giardia lamblia* (revisto por Adam, 2001). Nesta Dissertação, o último nome será utilizado.

1.2 CLASSIFICAÇÃO

Reino – Protista

Subreino – Protozoa

Filo – Sarcomastigophora

Subfilo – Mastigophora

Classe – Zoomastigophora

Ordem – Diplomonadida

Família – Hexamitidae

Gênero – Giardia

Espécie – *Giardia lamblia*

1.3 O CARÁTER PRIMITIVO

Giardia lamblia é considerado por muitos pesquisadores, um protozoário que divergiu cedo da linhagem dos eucariotos, não possuindo muitas das organelas presentes

em eucariotos superiores, tais como: peroxissomos, aparelho de Golgi ou mitocôndria (Adam, 2001). Há uma grande discussão na literatura sobre o ponto em que a linhagem de *G. lamblia* divergiu do ramo das outras células eucarióticas. Mais precisamente, a dúvida é se esta divergência ocorreu antes ou depois do evento evolutivo que levou ao surgimento da mitocôndria. Esta discussão é importante para entendermos o caráter primitivo deste parasita. Roger e colaboradores (1998) encontraram uma chaperonina típica de mitocôndria - cpn60 - em *G. lamblia*, mostrando que a família diplomonadida poderia ter tido um endossimbionte aparentado com aquele que deu origem à mitocôndria. Mais tarde, Arisue e colaboradores (2002) encontraram genes de hsp-70 (uma proteína de choque térmico mitocondrial) em *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica* e dois microsporídios (*Encephalitozoon hellem* e *Glugea plecoglossi*). Isso reforçou a idéia de que a divergência evolutiva de *G. lamblia* se deu após a aquisição da mitocôndria, talvez por uma perda secundária (Knight, 2004). Tovar e colaboradores (2003) publicaram um trabalho identificando proteínas típicas mitocondriais (IscS e IscU) em organelas semelhantes às mitocôndrias – os mitossomos. A permeabilização da membrana externa da mitocôndria, induzida por BAX e posterior liberação do citocromo C no citoplasma é um evento chave na apoptose. Em trabalho recente, Hehl e colaboradores (2007) transfectaram o gene de BAX humana em *G. lamblia* e induziram sua expressão. Os mitossomos não foram destruídos, ao contrário do que acontece em mitocôndrias de outros organismos primitivos unicelulares. Contudo, as organelas da via secretória regulada foram prejudicadas, inibindo o encistamento; mostrando que a permeabilização aleatória de membrana induzida por BAX ainda funciona.

Em 1995a, Lujan e colaboradores observaram formação de estruturas similares ao Golgi durante o encistamento. Diversas características das vesículas de encistamento (VEEs) que são encontradas no complexo de Golgi tais como sensibilidade à brefeldina A (Lujan *et al*, 1995a), presença de GiRab11 e Giβ'COP (Marti *et al*, 2003), marcação positiva para C(6)-NBD-ceramida, um análogo lipídico específico de Golgi (Luján *et al*, 1995a; Hehl *et al*, 2000; Lafredi-Rangel *et al*, 2003). Mais tarde, Marti e colaboradores (2003) mostraram que as VEEs possuíam características de Golgi e eram formadas por vesículas oriundas do RE, que depois sofriam maturação por transporte retrógrado. Com isto, se *G. lamblia* não é mais tão especial por nunca ter tido mitocôndria, ela continua sendo um ótimo modelo evolutivo, já que diversas funções atribuídas a organelas específicas em células de mamíferos acontecem de forma completamente distinta em *G. lamblia*. Contudo, a ausência de organelas tão essenciais para outros organismos não

resultou em uma desvantagem para este parasita, distribuído largamente por todo o mundo.

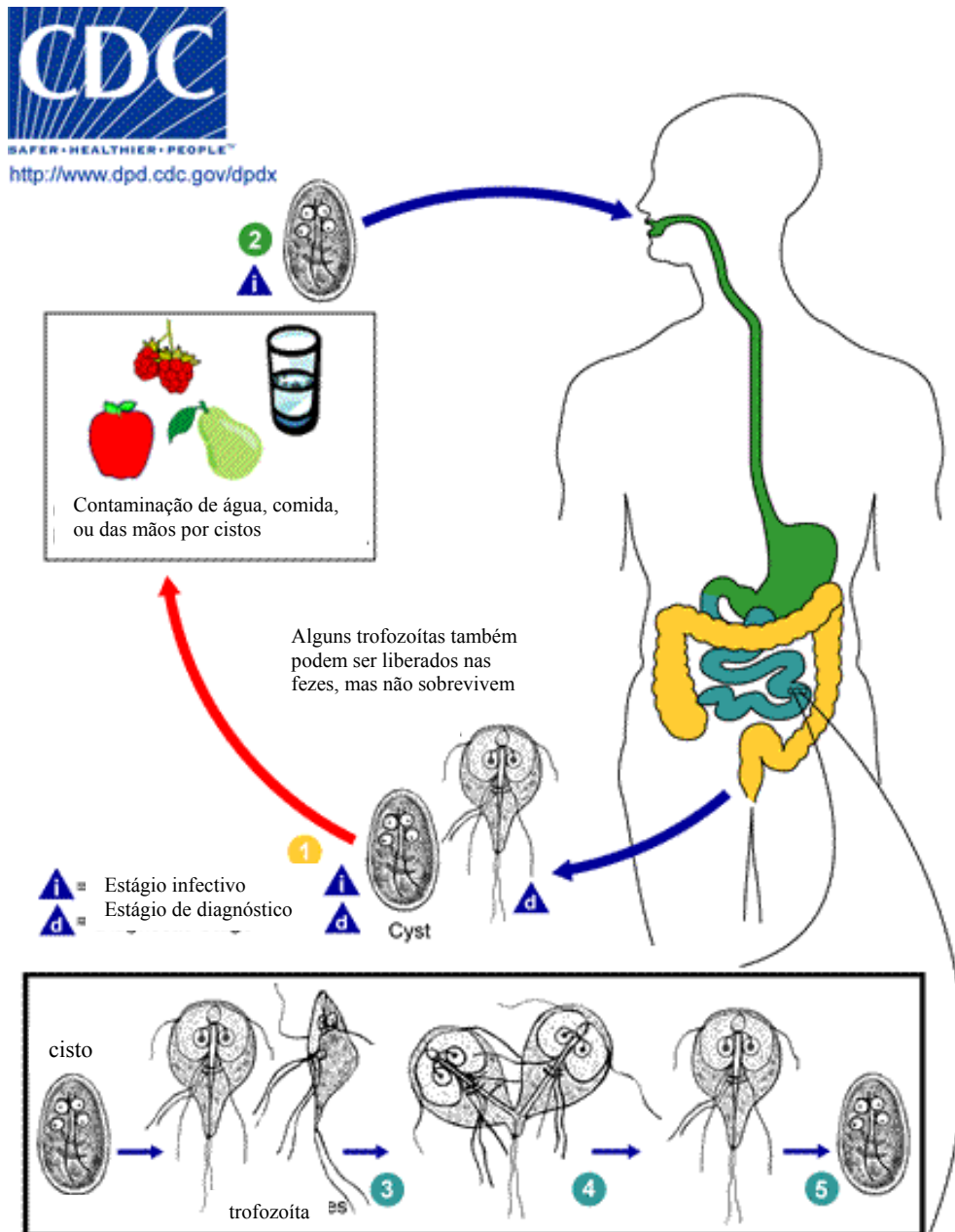
1.4 CICLO DE VIDA

O ciclo de vida de *Giardia lamblia* é bastante simples. A infecção começa quando o hospedeiro ingere o cisto (figura 1) – forma infectiva e resistente presente em água contaminada por fezes de animais infectados. Após a entrada do cisto no tubo digestivo, e contato com os ácidos estomacais, ocorre o desencistamento e emerge no intestino delgado um parasita quadrinucleado com ploidia de 16n, já que antes de se transformar em cisto, o trofozoíta sofre duas replicações do DNA sem que haja uma divisão entre elas. Desta forma o parasita recém desencistado pode rapidamente sofrer duas divisões celulares e resultar em quatro trofozoítas (Bernander *et al.*, 2001). Estes trofozoítas (do grego *trophos*, alimento) colonizam o jejuno do hospedeiro, fixando-se nas microvilosidades. No intestino delgado ocorrem sucessivas divisões e os trofozoítas formam um tapete sobre os enterócitos, dificultando a absorção de nutrientes e provocando diarreia – quadro característico da giardíase, embora casos assintomáticos sejam freqüentes. No final do intestino delgado alguns trofozoítas começam a se transformar em cistos, passando pelo processo de encistamento. Alguns autores acreditam que a baixa disponibilidade de nutrientes da porção do intestino delgado próxima ao intestino grosso possa favorecer essa transformação, como uma forma da *G. lamblia* entrar em dormência e sobreviver ao ambiente hostil (Lujan *et al.*, 1997). O cisto é liberado nas fezes do hospedeiro e pode contaminar água, alimentos ou diretamente outro hospedeiro (revisto por Adam, 2001).

1.5 O TROFOZOÍTA

Os trofozoítas de *G. lamblia* são piriformes e medem de 12 a 15 µm de comprimento e 5 a 9 µm de largura. Possuem dois núcleos localizados anteriormente, simétricos em relação ao eixo vertical e que não possuem nucléolo (Adam, 2001). Ambos os núcleos possuem cópias completas do genoma, dividem-se igualmente durante a citocinese, transcrevem de forma equivalente, mantêm a mesma ploidia, além de se replicarem simultaneamente (Wiesehahn *et al.*, 1984; Kabnick & Peattie, 1990; Bernander *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002). Contudo, Benchimol (2004) mostra uma diferença na quantidade de poros nucleares de *G. lamblia*, o que significaria uma diferença nos níveis de atividade nuclear.

No citoplasma de *G. lamblia* pequenas vesículas posicionadas paralelamente à membrana chamam a atenção. Atualmente denominadas vesículas periféricas, elas foram descritas por Owen em 1980. Reiner e colaboradores (1990) mostraram evidências de atividade de fosfatase ácida nestas vesículas. Kattenbach e colaboradores (1991) observaram,



adaptado de http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis_il.htm

Figura 1 – Ciclo de biológico de *Giardia lamblia*

O cisto de *G. lamblia* é ingerido pelo hospedeiros, passa pelo estômago e desencista no intestino delgado, dando origem a dois trofozoítas no final da citocinese. O trofozoíta se divide e coloniza o intestino delgado. Alguns parasitas, no final do intestino delgado, encistam e, não mais aderidos às microvilosidades do tecido, são liberados nas fezes. Os cistos podem contaminar suplementos de água e, por isso, também vegetais; que podem ser ingeridos por outro hospedeiro, reiniciando o ciclo.

por meio de criofratura, muitas vesículas localizadas próximas à membrana plasmática. Estas organelas apresentavam um conteúdo ácido, mostrado com o uso de laranja de acridina e possuíam fosfatase ácida (revelada pela citoquímica em microscopia eletrônica). Mais tarde, Lanfredi-Rangel e colaboradores (1998) utilizaram laranja de acridina, lucifer yellow e peroxidase como traçadores de endocitose e observaram que estes se acumularam nas vesículas periféricas; sugerindo que em *G. lamblia* o sistema endo-lisossomal esteja reduzido às vesículas periféricas, que corresponderiam a endossomas iniciais, tardios e lisossomos. Além disto, a reconstrução tridimensional mostrou uma interconexão entre estas vesículas, que se apresentaram organizadas em um grande sistema tubular.

Usando crioeletromicroscopia e anticorpos contra a proteína luminal de retículo endoplasmático BiP, Soltys e colaboradores (1996) observaram claramente esta estrutura em *G. lamblia*. Os perfis aparecem na região próxima ao núcleo e há marcação para BiP no envelope nuclear. Anteriormente o mesmo grupo havia localizado o gene para esta proteína no genoma de *G. lamblia* (Gupta *et al.*, 1994). Em 1998, usando glicose-6-fosfatase – um marcador de retículo endoplasmático, Lanfredi-Rangel e colaboradores também observaram esta organela em *G. lamblia*.

Como descrito anteriormente, existe uma grande discussão a respeito da presença do complexo de Golgi em *G. lamblia*. Em 1990, Reiner e colaboradores observaram cisternas que pareciam ser precursores das VEEs durante o encistamento do parasita. Posteriormente, outros autores descreveram o aparecimento de uma estrutura similar ao Golgi, induzida após o estímulo do encistamento (McCaffery *et al.*, 1994; Luján *et al.*, 1995a). Lanfredi-Rangel e colaboradores (1999), entretanto, utilizando NDB (nitrobenzoxadiazol) ceramida – um análogo lipídico fluorescente, marcador de complexo de Golgi – e observaram intensa marcação na região perinuclear. Em microscopia eletrônica de transmissão e criofratura foram observadas membranas concêntricas nesta mesma região, as quais se pareciam com as do complexo de Golgi. Luján e colaboradores (1995a) mostraram que o tratamento com brefeldina A inibia o transporte das proteínas de parede cística durante o encistamento, indicando que alguma estrutura semelhante ao Golgi era responsável pelo transporte das CWP's. Em 2002, Langford e colaboradores identificaram as proteínas Rab1 e Rab2 em *G. lamblia*, que estão envolvidas no transporte entre RE e Golgi. A localização de antígenos de COPI e COPII e da cadeia pesada da clatrina em VEEs (Marti *et al.*, 2003) corrobora a hipótese das vesículas de encistamento funcionarem como um aparelho de Golgi transiente.

Embora a forma clássica de Golgi não seja encontrada em trofozoítas, parece haver uma estrutura semelhante ao Golgi que se torna ainda mais evidente durante o encistamento. Evidências sugerem que as funções típicas de Golgi possam ocorrer em outras organelas, sem a morfologia característica (Adam, 2001).

Diversas estruturas compostas por microtúbulos estáveis são encontradas nos trofozoítas de *G. lamblia*: o disco ventral os flagelos, o corpo mediano e o funis. Mudanças pós-traducionais nas tubulinas α e β (incluindo acetilação e poliglicilação) que modificam a estabilidade dos microtúbulos, são características marcantes do citoesqueleto de *Giardia* (Campanati *et al.*, 2003). O disco adesivo é uma estrutura côncava, com profundidade máxima de 4 μ m, cobrindo toda a parte ventral anterior do trofozoíta (Adam, 2001). A porção de membrana adjacente ao disco é chamada de flange ventrolateral, a qual recentemente foi atribuída atividade adesiva (Erlandsen *et al.*, 2004). O disco adesivo é uma espiral de microtúbulos igualmente espaçados e ligados por pontes protéicas cruzadas (*cross bridges*). A parte central do disco é coberta apenas por membrana plasmática, sendo conhecida como *bare zone* – área nua (Holberton, 1973a; Adam, 2001). Microfítas compostas majoritariamente pela proteína giardina ligam os microtúbulos à membrana plasmática (Crossley e Holberton, 1983; Peattie *et al.*, 1989). Observando a co-migração com proteínas de ave em gel SDS-page, Feely e colaboradores (1982) sugeriram a presença de miosina, α -actinina e actina. Utilizando anticorpos para estas mesmas moléculas, foi encontrada uma marcação na borda do disco ventral, possivelmente correspondendo à flange ventrolateral. Contudo, este foi o único trabalho a encontrar marcação para actina em *G. lamblia*. Em 1995, Drouin e colaboradores sequenciaram o gene de actina de *G. lamblia*, que é monocópia, e encontraram em média 58% de identidade entre aminoácidos da proteína de *G. lamblia* com os das outras espécies pesquisadas. Uma análise da estrutura secundária potencial do RNA não revelou estruturas conservadas em relação às outras 9 espécies pesquisadas, indicando uma grande divergência do gene de actina de *G. lamblia* em relação às outras espécies, o que pode explicar a ausência de trabalhos posteriores ao de Feely (1982) que tiveram sucesso na marcação de actina neste parasita.

Acredita-se que o disco ventral esteja envolvido na adesão do parasita ao epitélio do hospedeiro (Holberton, 1973a; 1973b; 1974; Campanati *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2001; Campanati *et al.*, 2002; Elmendorf *et al.*, 2003), embora a forma pela qual a adesão aconteça ainda não esteja bem elucidada. O trofozoíta possui quatro pares de flagelos, que se iniciam em dois conjuntos de corpos basais que se encontram entre os

núcleos, na parte anterior ventral (revisto por Adam, 2001). Os flagelos são bilateralmente distribuídos e são organizados aos pares: anteriores, posterolaterais, ventrais e caudais (seus nomes correspondem ao local de onde emergem no corpo celular). Os flagelos foram descritos como sendo importantes para a movimentação e para a adesão do parasita (Hoberton, 1974). No entanto, Campanati e colaboradores (2002) demonstraram que mesmo em ambiente viscoso, com diminuição considerável da frequência de batimento flagelar, o trofozoíta continuava aderido.

O corpo mediano consiste em um feixe de microtúbulos, bastante característico do gênero *Giardia*, e sua morfologia ajuda a definir as espécies dentro do gênero. A espécie *G. lamblia* possui dois corpos medianos em forma de clava, localizados na linha média dos flagelos caudais, dorsalmente a eles. Sugere-se que ele possa estar associado à movimentação dos flagelos ou servir de reserva de microtúbulos para a formação do disco (Owen, 1980; Meng *et al.*, 1996; Campanati *et al.*, 2003; Piva e Benchimol, 2004).

O Funis é uma folha de microtúbulos que conecta os flagelos caudais aos postero-laterais. Os microtúbulos do funis são paralelos e há interconexões entre eles. Eles partem dos axonemas dos flagelos caudais e se direcionam a membrana plasmática, em um plano transversal à linha média (Benchimol *et al.*, 2004). O funis parece estar associado a proteínas contráteis, explicando o movimento de flexão da cauda de *G. lamblia* observada por Campanati e colaboradores em 2002 (Benchimol *et al.*, 2004).

No citoplasma de *G. lamblia* é possível observar a presença de diversos pontos eletrondensos, que correspondem aos grânulos de glicogênio. Por ser um organismo microaerofílico, *G. lamblia* conta com a hidrólise de glicogênio como principal fonte de energia (revisado por Adam, 2001). Ladeira e colaboradores (2005) isolaram os grânulos do citoplasma do parasita, confirmando que se tratava realmente de glicogênio.

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela facilmente observável em microscopia eletrônica de transmissão. Os perfis de RE aparecem próximos aos núcleos. Gupta e colaboradores (1994) encontraram um gene cuja sequência previa uma porção C-terminal típica de retenção do RE, e o gene foi identificado com sendo de uma Hsp70; demonstrando que *G. lamblia* possui um retículo endoplasmático com características semelhantes aos outros eucariotos. McCaffery e Gillin (1994) confirmaram a existência do restículo endoplasmático em *G. lamblia* por microscopia eletrônica de transmissão. Lanfredi-Rangel e colaboradores (2003) observaram perfis de RE marcados com glicose-6-fosfatase associados às vesículas de encistamento (VEEs), que transportam o material formador da parede cística. Mais tarde, Stefanic e

colaboradores (2006), utilizando a técnica de proteômica, verificaram a existência de proteassomos – estruturas de controle de qualidade de proteína típicos de RE – em VEEs.

1.6 O CISTO

Os cistos de *G. lamblia* medem de sete a dez micrômetros de comprimento e podem ser redondos ou ovais (Adam, 2001). Seu revestimento é formado por duas camadas glicoprotéicas, cuja permeabilidade relativa não é conhecida (Chaves-Munguía *et al*, 2004). Entre a parede cística e a membrana do parasita há um intervalo chamado de espaço peritrófico. A camada externa é composta de uma rede de filamentos de sete a 20nm (Erlandsen *et al.*, 1989;1990;1996) e mede aproximadamente 0,25µm de espessura (Chávez-Munguía *et al.*, 2004). Sua composição inclui carboidratos e proteínas. Anteriormente acreditava-se que o açúcar majoritário era a N-acetil-glicosamina, monômero da quitina (Ward *et al.*, 1985). Contudo, novas técnicas como a espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear possibilitaram uma análise mais precisa, revelando que a parede cística de *G. lamblia* é formada por um polímero de β(1-3)-N-acetil-D-galactosamina (Gerwig *et al.*, 2002). Três proteínas da parede cística foram identificadas – CWP1, CWP2 e CWP3 de, respectivamente, 26, 39 e 27,3 kDa (Mowatt *et al.*, 1995; Luján *et al.*, 1995b; Sun *et al.*, 2003) – e também fazem parte da composição da parede na proporção de 2:3 em relação aos carboidratos (Gerwig *et al.*, 2002).

1.7 O ENCISTAMENTO

O processo de encistamento de *G. lamblia* é um ponto crucial para a permanência do parasita no ambiente. Este processo, apesar de contínuo, pode ser dividido em 3 etapas: (i) estímulo para o encistamento e regulação da expressão de genes específicos, (ii) síntese e transporte intracelular dos componentes da parede cística (iii) montagem da parede cística (Luján *et al.*, 1997).

Existem muitos métodos usados para estimular o encistamento. O primeiro deles foi idealizado por Gillin e colaboradores (1988). O pH mais alcalino (7,8) associado a glicocolato – um ácido biliar – e ácido mirístico produziu um grande número de cistos. A partir de então a bile foi considerada o estímulo majoritário para o encistamento. Em 1996, Lujan e colaboradores usaram diversos componentes lipídicos e concluíram que

não a bile, mas a depleção de colesterol causada por ela induzia o encistamento. Maia e colaboradores (2007) observaram que o tratamento com azasterol, (um inibidor de $\Delta^{24,25}$ -esterol metil-transferase - uma enzima da via biossintética de esteróis) levava ao encistamento, com a formação de VEEs anormalmente grandes. Contudo, esta via biossintética não foi encontrada em *G. lamblia*, sugerindo outro alvo.

Em 1997, Lujan resumizou os métodos até então usados para induzir o encistamento que podem ser divididos de forma mais geral da seguinte maneira:

- Adição de bile bovina, humana ou suína, adição de ácido láctico e pré-incubação em meio sem bile (Gillin *et al.*, 1987; 1988; 1989; Schupp *et al.*, 1988, Reiner *et al.*, 1993);
- Privação de bile numa atmosfera rica em nitrogênio (revisto por Lujan *et al.*, 1997);
- Privação de colesterol pela adição de um soro sem lipoproteínas (Lujan *et al.*, 1996).

Embora o estímulo orgânico para o encistamento não seja bem conhecido, é sugerido que a ausência de nutrientes na porção terminal do intestino delgado possa agir como um ambiente desfavorável, induzindo a diferenciação (Lujan *et al.*, 1997).

O método mais utilizado foi aquele desenvolvido por Gillin e colaboradores, em 1989. Apesar de se basearem na privação de lipídios e lipoproteínas, os métodos produzem cistos em tempos distintos. O idealizado por Gillin e colaboradores, há cistos completos após 24 horas de indução, e no método de Luján e colaboradores, em sete horas.

Após sua síntese no retículo endoplasmático as proteínas de parede cística são secretadas pelas vesículas específicas de encistamento (VEE), inicialmente descritas por Gillin e colaboradores (1990) como grandes vesículas osmiofílicas que eram formadas durante a diferenciação. Em momentos iniciais do encistamento, fendas eram observadas no citoplasma, que se tornavam repletas de material eletrondenso. Lanfredi-Rangel e colaboradores (2003) em um trabalho sobre os aspectos morfológicos do encistamento, demonstraram o aparecimento de fendas citoplasmáticas no trofozoíta, após 6 horas de indução ao encistamento. Estas eram posteriormente semipreenchidas de material eletrondenso, típico daquele formador da parede cística. Além das fendas, vesículas triangulares foram vistas, sugerindo uma forma intermediária entre as fendas e VEEs. Uma marcação de glicose-6-fosfatase demonstrou que as fendas se originavam

do retículo. O grupo sugere então uma nova via secretória, em que o RE tenha características de Golgi.

Após síntese e transporte, ocorre a montagem da parede cística fora da célula. Lanfredi-Rangel (2002) sugere que após 18 horas de encistamento, ESVs estejam se fundindo à membrana citoplasmática. O momento de fusão das VEEs com a membrana da célula para exocitose do material formador não foi flagrado ainda, mas sabe-se que a montagem é feita fora da célula e que o material fibrilar é depositado de forma sequencial (Erlandsen *et al.*, 1996).

1.8 INIBIDORES DO ENCISTAMENTO

Muitas drogas já foram utilizadas para inibir o encistamento de *G. lamblia* e de outros protozoários anaeróbicos como *Entamoeba invadens*, um parasita de lagartos capaz de encistar *in vitro*. Orizalina, uma ninitroanilina, é capaz de despolimerizar microtúbulos e já foi usada com sucesso na inibição do crescimento e encistamento de *E. invadens* (Makioka *et al.*, 2000a; 2002). O mesmo grupo testou ainda jasplakinolida, um estabilizador do esqueleto de actina (Makioka *et al.*, 2001a); citocalasina D, um despolimerizador do esqueleto de actina, além das citocalasinas B, E e dihidrocitocalasina B. Eles também se mostraram inibidores do encistamento de *E. invadens* (Makioka *et al.*, 2000b; 2004). Afidicolina, um inibidor da DNA polimerase de eucariotos também foi usado com sucesso na inibição do encistamento do mesmo protozoário (Kumagai *et al.*, 1998). Poliaminas como putrescina, espermidina e espermina foram usadas por Calvo-Mendéz e colaboradores, em 1993, e diminuíram as taxas de encistamento de *E. invadens*. Todos estes resultados indicam que diversas vias intracelulares levam ao encistamento e que um desequilíbrio em apenas uma delas pode levar ao estímulo para encistar, no caso da *E. invadens*. Ainda no caso deste parasito, as vias de sinalização que levam a este processo foram estudadas usando inibidores. Diversos inibidores de proteína cinase C (cloreto de cheleritrina, calfofina C, D-eritro-esfingosina e Staurosporina) foram usados com sucesso para bloquear o encistamento de *E. invadens* (Makioka *et al.*, 2000c; 2000d). Makioka e colaboradores (2001b) mostraram a grande importância da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) para a via de sinalização que leva ao encistamento, por meio do uso da wortmanina.

O envolvimento de proteínas cinase como transdutores de sinal na diferenciação de protozoários e células de mamíferos é conhecido, porém pouco compreendido no caso de protozoários primitivos, como *G. lamblia*. Trabalhos recentes de investigação molecular apontaram a existência de PI3K no parasita e sua possível importância na

regulação do crescimento e encistamento (Cox *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2007). Ainda mais recentemente Bazan-Tejeda e colaboradores (2007) confirmaram mudanças na expressão de proteína cinase C (PKC) durante o processo de encistamento, ressaltando a sua participação na regulação durante este processo.

1.9 SINALIZAÇÃO

1.9.1 Proteínas cinases e fosfatases

As vias de sinalização levam à plasticidade das funções celulares funcionando como interruptores moleculares. Diversos genes regulam diferentes respostas celulares possíveis. Para que determinada resposta ocorra ou cesse, moléculas mudam suas conformações, passando a interagir com outras, diferentes das primeiras. As proteínas cinases modificam a estrutura de outras moléculas, transferindo um fosfato do ATP a estas. Essa mudança de conformação leva à ativação de ligação a outras proteínas, fazendo a transdução do sinal e sua amplificação. As proteínas fosfatases retiram um fosfato de uma molécula, também ocasionando mudança conformacional e desligamento de determinada função e ativação de outra.

Em *G. lamblia* as vias de sinalização não são muito conhecidas e apenas recentemente foram identificadas proteínas cinases e fosfatases. Em 2001, Abel e colaboradores identificaram uma PKA (cinase de adenosina mono fosfato cíclica – cAMP) em *G. lamblia*, chamada de gPKA, e sugeriram uma importante participação desta enzima na mobilidade do trofozoíta durante o crescimento vegetativo e no desencistamento. Gibson e colaboradores (2006) demonstraram a presença de uma subunidade catalítica (gPKAc) e regulatória (gPKAr) nesta proteína. Neste trabalho foi verificado um redução da concentração de gPKAr e aumento da atividade de gPKAc (embora sem diferença na concentração desta última) durante o encistamento, além de uma diferença na localização de gPKAc entre trofozoítas e cistos, sugerindo que a gPKA também tenha grande importância nas fases finais do encistamento.

Em 2005, Kim e colaboradores usaram uma combinação de técnicas de PCR para isolar a PKB de *G. lamblia* (GiPKB), e demonstraram a regulação positiva desta cinase durante o encistamento e grande frequência da histona H1 como substrato.

Dois membros da família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), Erk1 e Erk2, foram descritos em *G. lamblia*, cujas concentrações diminuem durante o encistamento. A distribuição de ERK2 muda de associada aos núcleos e flagelos caudais para mais difusa e citoplasmática durante o encistamento, enquanto a

de ERK1 permanece associada ao corpo mediano e bordas do disco ventral (Ellis *et al.*, 2003).

A proteína fosfatase 2A (PP2A) é uma fosfatase de resíduos de serina/treonina. Sua importância para o desencistamento de *G. lamblia* foi demonstrada por Lauwaet e colaboradores (2007). O uso da técnica de RNA de interferência (iRNA) para inibição de PP2A resultou em diminuição de VEEs e de cistos viáveis. Além disto, a expressão de PP2A é positivamente regulada durante o encistamento, sugerindo participação nestes dois eventos. Esta fosfatase também foi localizada em estruturas do citoesqueleto típicas de *G. lamblia*.

1.9.2 A via da proteína cinase C

A PKC é uma enzima que retira um fosfato do ATP e o transfere para um resíduo de serina/treonina de uma proteína alvo. Possui uma subunidade catalítica e outra regulatória. O domínio regulatório possui uma região rica em cisteína, com variações dentro das isoformas. O domínio catalítico possui um sítio de ligação ao ATP (Hug & Sarre, 1993).

As 12 isoformas desta enzima estão subdivididas em 3 classes. As PKCs convencionais (cPKC), α , β I, β II e γ são dependentes de Ca^{2+} e são ativadas por fosfatidilserina e diacilglicerol (DAG), um produto da quebra de fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato pela fosfolipase C. As PKCs novas são independentes de Ca^{2+} e ativadas pelas mesmas moléculas que as cPKCs. Fazem parte deste grupo as δ , ϵ , η , ν , μ e θ PKCs. As PKCs atípicas (ζ e ι/λ) são independentes de Ca^{2+} e não são ativadas por DAG, embora a fosfatidilserina regule sua atividade (Mellor e Parker, 1998).

Em mamíferos, a PKC pode regular, por exemplo, o crescimento e diferenciação, além do citoesqueleto de actina (Hug e Sarre, 1993; Larsson, 2006). Em *Entamoeba histolytica* o uso de inibidores de PKC diminuiu drasticamente as taxas de encistamento, sugerindo fortemente que a PKC tenha um papel importante na diferenciação deste parasita (Makioka *et al.*, 2000c). Recentemente, Bazan-Tejeda e colaboradores (2007) demonstraram a presença de diversas formas da PKC em *G. lamblia* e aumento de sua expressão e mudança de localização durante o encistamento. Além disto, o uso de inibidores específicos mostrou drástica redução nas taxas de encistamento, sugerindo importante participação da PKC.

1.9.3 A via da tirosina cinase

Tirosina-cinase é uma proteína capaz de transferir o fosfato γ de um ATP para o grupo hidroxila do resíduo de tirosina de uma proteína alvo. Ela é, portanto, uma cinase de proteínas, diferente da PI3K, que fosforila lipídeos. A fosforilação dos resíduos de tirosina modula a atividade enzimática e cria sítios de ligação com outras proteínas sinalizadoras *downstream* da cascata de sinalização (Hubbart e Till, 2000). Essas enzimas são divididas em dois grandes grupos: receptores e não-receptores.

Os receptores tirosina-cinase (RTK), são glicoproteínas transmembrana ativadas pela interação com seu ligante e fazem a transdução do sinal para o citoplasma fosforilando resíduos de tirosina no próprio receptor ou em outras proteínas sinalizadoras. Entre os RTK estão os receptores para insulina e outros para diversos fatores de crescimento em eucariotos superiores, como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento nervoso (NGF). Diversas são as atividades disparadas pelos RTK: Crescimento, proliferação, diferenciação, migração e mudanças metabólicas (revisado por Hubbard e Till, 2000). Além disso, os RTK interagem com outras cinases como a PI3K e, em última análise, por meio da cascata de sinalização, interagem virtualmente com milhares de moléculas sinalizadoras, levando a diversas respostas celulares (Sebolt-Leopold e English, 2006).

Os não-receptores tirosina-cinase (NRTK) são proteínas citoplasmáticas que fazem parte da cascata de sinalização disparada por RTK, proteínas G e outros receptores do sistema imune (Hubbard e Till, 2000). Existe uma enorme variedade de NRTK, como as famílias Abl, JaK (Janus Kinases), FeS, FAK (Focal Adesion Kinases) e Src – um dos primeiros proto-oncogenes descobertos (revisado por Chang *et al.*, 2007). Os NRTK estão associados também ao citoesqueleto. Recentemente, Ma e Sayeski (2007) demonstraram que a tubulina pode ser fosforilada por JaK e interagir com transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1 (STAT1). FaK podem modular a polimerização de actina e controlar a adesão focal (Schober *et al.*, 2007). Src pode interagir com outras cinases, inclusive NRTK, para induzir diversas respostas celulares. Westhoff e colaboradores (2004) observaram a fosforilação de FAK por Src e sua influência na adesão focal, sobrevivência e modificação do citoesqueleto de actina.

1.9.4 A via da PI3K

Fosfatidilinositol é um fosfolípido que possui um anel inositol em sua cabeça polar, ligado pelo grupo 1'-OH. Nas células, todos os grupos OH livres do anel inositol podem ser fosforilados (exceto o 2' e o 6'), em diferentes combinações. Um fosfatidilinositol fosforilado é chamado de fosfoinosítido (PtdIns). As diversas funções desempenhadas pelos fosfoinosítidos são determinadas pela combinação de grupamentos fosfato ligados aos grupamentos OH.

A fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) é uma enzima capaz de retirar um fosfato da adenosina trifosfato (ATP) e transferi-lo para o grupamento 3'-OH de fosfatidilinosítois e alguns PtdIns. Ela é, portanto uma cinase de lipídios. Contudo, seu produto não pode ser degradado pela fosfolipase C, como acontece com outros PTDINSs que podem ser clivados em diacilglicerol e fosfoinosítois solúveis. Isso separa a transdução de sinal decorrente da cascata de sinalização iniciada pela PI3K daquela resultante da ação da fosfolipase C (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999).

A função primária do produto da PI3K é servir de sítio de ancoragem na membrana, mediando o recrutamento de outras proteínas (Deane e Fruman, 2004). A PI3K possui três distintas classes, cujas estruturas e substratos diferem bastante.

Os membros da Classe I são heterodímeros e possuem uma subunidade catalítica de 110kD e outra regulatória (Carpenter *et al.*, 1990; Kapeller e Cantley, 1994) e fosforilam *in vitro* tanto PtdIns, PtdIns(4)P e PtdIns(4,5)P₂, embora *in vivo* haja maior fosforilação de PtdIns(4,5)P₂ (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999). Este substrato é exclusivo da isoforma I da PI3K (Deane e Fruman, 2004).

Entre as PI3Ks, as da classe I são reguladas pelo estímulo de receptores de membrana. O tipo I_A é estimulado por receptores tirosina-cinase e proteína-tirosina cinases intracelulares, enquanto o tipo I_B é ativado por receptores acoplados à proteína G. Ambos os tipos também podem ser ativados por Ras (Welch *et al.*, 2003). O subgrupo I_A existe como diversas isoformas, e pode apresentar diversas subunidades regulatórias, com diferentes domínios. O tipo I_B existe como apenas uma isoforma e possui subunidade catalítica (p110 γ) e regulatória (p101), nomeadas de acordo com seu peso molecular em kDa. Esta classe está presente em células do sistema imune de mamíferos (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001).

As PI3Ks da classe II possuem três diferentes isoformas da subunidade catalítica e não são constitutivamente associadas à subunidade regulatória (Fruman *et al.*, 1998; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Seu substrato é comumente PtdIns, embora

eventualmente possa fosforilar PtdIns(4)P em PtdIns(4,5)P₂. Sugere-se que a atividade de PI3Ks classe II possam ser reguladas por sinais extracelulares, pouco se sabe sobre sua função (Deane e Fruman, 2004).

As cinases da classe III são conservadas dos humanos às leveduras e possuem apenas uma isoforma. Como substrato esta enzima utiliza apenas o PtdIns, transformando-o em PtdIns(3)P. Esta PI3K tem como localização as vesículas endocíticas, onde sua maior função parece ser no controle do tráfego de proteínas e vesículas (Deane e Fruman, 2004).

Em *G. lamblia*, Cox e colaboradores (2006) identificaram e expressaram dois genes putativos codificantes de PI3Ks (Gipi3k1 e Gipi3k2) que corresponderiam às enzimas das classes I e III. Isto indica que as funções controladas pelas cinases da classe I (transdução de um sinal extracelular) e da classe III (tráfego intracelular de vesículas) possam ser controladas pela PI3K neste parasita.

1.10 PROTEASSOMAS E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS

A degradação de proteínas em eucariotos possui dois caminhos: via lisossomos e via proteassomas (Goldberg *et al.*, 1995). A primeira está envolvida na degradação de proteínas associadas à membrana e/ou proteínas endocitadas. Já a segunda via está associada à degradação de proteínas mal enoveladas ou montadas erradamente e ao controle do ciclo celular pela degradação seletiva de proteínas regulatórias, como os fatores de transcrição e as ciclinas (Paugam *et al.*, 2003). A proteína é marcada para degradação com ubiquitina e degradada no complexo 26S, com gasto de ATP (Lee e Goldberg, 1998). Um inibidor de proteassoma conhecido é a lactacistina, isolada originalmente de actinomicetos. Esta droga inativa os proteassomas ligando-se covalentemente a eles, resultando na inativação das atividades quimiotripsina e tripsina-*like* do proteassoma. Em solução aquosa, a lactacistina é convertida em clasto-lactacistina β-lactona, que é a forma ativa do inibidor. As duas formas também inibem catepsina A (Lee e Goldberg, 1998). O aldeído peptídico MG-132 é um análogo do estado de transição¹ e afeta a atividade quimiotripsina-*like* dos proteassomas, embora também tenha efeito inibitório em catepsinas e calpaínas (Lee e Goldberg, 1998).

Scholze e colaboradores (1996) descreveram a presença de proteassomas em *E.*

¹ Análogo do estado de transição é um substrato desenhado para mimetizar as propriedades ou a geometria do estado de transição de uma reação. (IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition, 1997)

histolytica. O bloqueio do encistamento de *E. invadens* pela ação da lactacistina foi demonstrado por Gonzalez e colaboradores (1997; 1999) e por Makioka e colaboradores (2002). A inibição do crescimento de *E. histolytica* por lactacistina e MG-132 foi significativa para concentrações de até 1 μ M e 50 μ M, respectivamente (Makioka *et al.*, 2002). Para *E. invadens* apenas concentrações de 10mM de lactacistina e clasto-lactacistina β -lactona inibiram o crescimento significativamente, enquanto concentrações de 5 μ M de lactacistina, 1 μ M clasto-lactacistina β -lactona e 50 μ M de MG-132 inibiram o encistamento significativamente (Makioka *et al.*, 2002). Além destes resultados, Makioka e colaboradores observaram multinucleação e aumento do número de grânulos de glicogênio no citoplasma com o uso dos três inibidores de proteassomas.

Em 1999, Emmerlich e colaboradores isolaram a subunidade 20S de *G. lamblia*, correspondente ao centro protéico catalítico. Posteriormente, a subunidade alfa foi caracterizada (Emmerlich *et al.*, 2001). O proteassoma de *G. lamblia* é tipicamente eucarioto, mas o efeito da inibição não foi ainda demonstrado (Paugam *et al.*, 2003). Svärd e colaboradores (2003) propõem um ponto de restrição em G2 ou M, em que os parasitas podem se diferenciar em cistos.

2.RACIONAL

O processo de encistamento de *G. lamblia* é crucial para sua manutenção no ambiente e posterior infecção de outro hospedeiro. Devido à localização extremamente basal deste protozoário na árvore filogenética, podemos observar nele diversas características comuns aos primeiros eucariotos. As adaptações que resultaram na sincronia da biologia deste protozoário com a de seu hospedeiro são provavelmente muito antigas e, exatamente por isso, importantes de serem estudadas, já que representam importantes passos evolutivos em relação ao parasitismo. Por outro lado, a grande diferença deste protozoário em relação aos modernos eucariotos demonstra que eles estão eficazmente adaptados ao ambiente. Os estímulos que levam à indução do encistamento *in vitro* foram bastante estudados, enquanto os estímulos *in vivo* continuam desconhecidos. Sabemos, contudo, que os estímulos externos só se transformam em mudança de comportamento de um organismo ou célula quando há transdução de sinal. Para isso as proteínas cinases e fosfatases são de extrema importância, pois controlam as cascatas de sinalização que levam a diversas mudanças celulares. Desta forma, para conhecer melhor o processo de encistamento da *G. lamblia* é fundamental começar a entender a sinalização envolvida neste processo. Nossa hipótese de trabalho é que a transformação do trofozoíta em cisto envolva moléculas sinalizadoras já descritas como participantes de processos de diferenciação em outros organismos como fosfatases, proteínas da família das proteína cinases C, das tirosinas cinase e da fosfatidilinositol-3-cinase, além da participação de proteassomos.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Neste contexto, o objetivo geral desta dissertação é investigar quais moléculas sinalizadoras podem estar envolvidas no encistamento de *Giardia lamblia* e como elas atuam.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar a ultraestrutura do processo de encistamento.

3.2.2 Observar a distribuição de proteínas de parede cística no cisto pré-formado e no cisto completo

3.2.3 Verificar, com a utilização de inibidores específicos, a possível participação de cinases na proliferação de *G. lamblia*

3.2.4 Verificar, com a utilização de inibidores específicos, a possível participação de fosfatases no encistamento

3.2.5 Verificar, com a utilização de um inibidor específico, a possível participação dos proteassomas no encistamento

3.2.6 Verificar em que etapas do encistamento agem os inibidores de cinases e fosfatases capazes de afetar o encistamento

3.2.7 Estudar quantitativamente a produção de proteína da parede cística 2 (CWP2), na presença dos inibidores efetivos do encistamento.

3.2.8 Estudar as mudanças ultraestruturais ocorridas ao longo do processo de diferenciação em células controle em células tratadas com inibidores de cinases e fosfatases

3.2.9 Estudar por microscopia de fluorescência, a distribuição de CWP2 nos parasitas controle e em parasitas tratados com inibidores de cinases e fosfatases

3.2.10 Verificar a capacidade endocítica dos parasitas após 48h de estímulo ao encistamento na situação controle e no encistamento na presença do inibidor da PI3K

4.METODOLOGIA

4.1 CULTIVO

Os parasitos são cultivados em meio TYI-S-33 modificado (Keister, 1983) com 10% de soro bovino adulto inativado em tubos de vidro de 15mL. Repiques são feitos a cada 72 ou 96h colocando-se o tubo original no gelo por 15 minutos, retirando-se uma alíquota e inoculando-a em um novo tubo contendo meio de cultura.

4.2 ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO

Trofozoítos foram cultivados em meio de cultura sem adição de bile (meio de pré-encistamento) por 48 horas, centrifugados a 500g por 10 minutos e o sobrenadante descartado, substituído pelo meio de encistamento (cuja composição tem como base o meio de pré-encistamento, além de 12mg/mL de bile bovina, 0,9μL/mL de ácido láctico e pH: 7,8).

4.3 TESTE DE INIBIÇÃO DO ENCISTAMENTO

As drogas testadas são inibidores de cinases, fosfatases ou proteassomos, de acordo com a tabela:

Droga	ação
Wortmanina (Sigma)	Inibidor da PI3K
LY294002 (Sigma)	Inibidor da PI3K
Staurosporina (Sigma)	Inibidor da PKC
Genisteína (Sigma)	Inibidor da tirosina cinase
Ácido okadaico (Sigma)	Inibidor de ser/tre fosfatases
Clastolactacistina-β-lactona	Inibidor de proteassomos

O encistamento foi induzido seguindo o protocolo descrito por Gillin e colaboradores (1989). 5×10^4 trofozoítas/mL foram incubados em meio de pré-encistamento a 37°C por 48h. Após este período, os parasitas foram incubados em meio de encistamento a 37°C. As drogas eram adicionadas no momento da indução ao encistamento. Após 48h, as amostras foram recolhidas colocando os tubos em banho de

gelo por 15 minutos e centrifugando-os por 2 minutos e 12000g em centrífuga Sorvall RMC14. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 300µL de líquido de contagem (formaldeído 10% em PBS v/v). Para contagem diferencial de trofozoítas e cistos, foram contadas 400 células em campos aleatórios, em microscopia de contraste de fase. A partir daí a porcentagem de cistos do controle foi considerada 100% e os outros valores foram normalizados.

4.4 TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

5×10^4 trofozoítas/mL foram incubados em meio TYI-S-33 modificado (Keister, 1983). Após 24h as drogas foram adicionadas ao meio de cultura e os pontos da curva recolhidos 24, 48, 72 e 96h após o início da curva como descrito acima. Os trofozoítas foram contados em câmara de Neubauer.

4.5 MICROSCOPIA ÓTICA

Os parasitos tratados e controle foram fixados em líquido de contagem, montados entre lâmina e lamínula e observados em microscopia de contraste interferencial diferencial em microscópio Zeiss Axioplan equipado com câmera digital 3CCD Hamamatsu (Hamamatsu – EUA) e a aquisição de imagens foi feita com o *software* da própria câmera.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para analisar os efeitos ultraestruturais dos parasitas na presença ou ausência das drogas, os parasitos foram colocados em banho de gelo por 15 minutos e centrifugados a 500g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet fixado em solução de Karnowsky modificado (glutaraldeído 2.5%, formaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1M) por 1 hora. O material foi então lavado em cacodilato de sódio 0.1M, pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 1,25% e cloreto de cálcio 5mM no mesmo tampão por 50 minutos. As células foram lavadas novamente no mesmo tampão e desidratadas em série crescente de acetona (30 a 100%). Após esta etapa, a amostra foi infiltrada em resina epoxi, na proporção de 2 partes de acetona para 1 de resina por 12 horas; 1:1 acetona/resina por 24 horas, 1:2 acetona/resina por 24 horas, resina pura por 24 horas e, após este período o material foi colocado em formas para polimerização por 72 horas. Os blocos obtidos foram trimados e cortados em faca de diamante Diatome no ultramicrotomo Reichert Ultracut (Alemanha). Os cortes de 50

a 70 nm foram recolhidos em grades de cobre de 300 mesh, contrastados com 5% de acetato de uranila em água por 40 minutos e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), por 5 minutos. Após secarem, as grades foram observadas em microscópio Zeiss 900 ou Jeol 1200 operando a 80kV.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os parasitos foram fixados com o mesmo método descrito para microscopia eletrônica de varredura, aderidas em lamínulas cobertas com poli-L-lisina 0,1% em PBS(no caso de trofozoítas) ou gelatina 1% em água (no caso de parasitos induzidos ao encistamento), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 1,25% e cloreto de cálcio 5mM no mesmo tampão por 50 minutos. As células foram lavadas novamente no mesmo tampão e desidratadas em série crescente de etanol (30 a 100%). A amostra foi seca pelo método do ponto crítico do CO₂ no aparelho Balzer's. O material então foi coberto com ouro e observado no microscópio JEOL JSM 5310.

4.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Amostras foram quantificadas pelo método de Bradford, 1976, utilizando albumina do soro bovino – BSA (fração V) como padrão.

4.9 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

5×10^4 trofozoítas/mL foram incubados em meio de pré-encistamento a 37°C por 48h. Após este período, os parasitos foram incubados em meio de encistamento a 37°C, na presença ou não das drogas testadas. Após 48h, as amostras foram recolhidas e ressuspensas em coquetel de inibidores de protease (sigma), e congeladas. Após dosagem de proteínas a concentração protéica foi ajustada em tampão de amostra (Laemmli, 1970). Cada material foi aplicado em um *lane* de um gel de acrilamida 10% para análise do perfil protéico.

Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O sistema foi incubado com tampão de bloqueio TBS-Tween-leite desnatado por 1h e, em seguida, incubado com anticorpo anti CWP2 (gentilmente cedido por Francias Gillin) por 1h em temperatura ambiente. A membrana foi lavada em tampão de bloqueio e incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Amershan) por mais 1h. Ao término, o sistema foi revelado pelo Kit ECL GE Healthcare.

4.10 ENSAIO DE ENDOCITOSE

Parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas ou tratados com 10 μ M de LY294002 no momento do encistamento e recolhidos após 48 horas foram centrifugados a 1000g por 10 minutos, lavados com PBS e aderidos vivos em lamínulas cobertas com 1% de gelatina por 30 minutos a 37°C. Após esta etapa os parasitas foram lavados com PBS e incubados com Lucifer Yellow (Fluka) 2 μ g/mL por 25 minutos a 37°C. Os parasitos foram então lavados com PBS e observados em microscópio Zeiss Axioplan equipado com câmera digital 3CCD Hamamatsu (Hamamatsu – EUA) e a aquisição de imagens feita com o *software* da própria câmera.

4.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os parasitos coletados foram fixados em formaldeído 4% em PBS, lavados e aderidos em lamínulas previamente cobertas com gelatina 1%. A permeabilização foi feita usando-se PBS com 0,5% de Tritton X-100. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com BSA 3%, gelatina de peixe 0.5% e Tween 20 0.02% (pH 8.0) por 30 minutos. A amostra foi incubada com o anticorpo primário (gentilmente cedido pela Profa. Francis Gillin) contra CWP2 em câmara úmida por uma hora, lavados em tampão de bloqueio, incubados com anticorpo secundário por uma hora (*Goat anti-mouse* IgG acoplado a Alexa 488; Molecular Probes). As amostras foram lavadas em PBS, montadas em N-Propil-Galato (Sigma) 0,2N em solução de glicerol:PBS na proporção de 9:1 e observados no microscópio Axioplan Upright Microscope (Zeiss – Germany). As imagens foram capturadas em uma câmera 3CCD Hamamatsu (Hamamatsu – EUA) e a aquisição de imagens feita com o *software* da própria câmera, utilizando o jogo de filtros para observação de FITC

5. RESULTADOS

5.1 INIBIÇÃO DO ENCISTAMENTO DE *G. lamblia*

5.1.1 Inibidores de cinases

Para avaliar a participação da PI3K no encistamento, os parasitas foram tratados com 1, 2 e 3 μ M de Wortmanina, um inibidor da PI3K que se liga ao sítio catalítico desta cinase, no momento do estímulo ao encistamento. Como pode ser observado na figura 2a, não há diferença significativa entre a quantidades de cistos obtidos na preparação controle e as amostras tratadas ($p > 0,05$). Um outro inibidor da PI3K também foi utilizado. Embora ele também se ligue ao sítio catalítico da enzima, a ligação não é idêntica. Os parasitos foram tratados com 1, 5 e 10 μ M de LY294002 no momento do estímulo ao encistamento. Como pode ser observado na figura 2b, houve uma significativa redução no encistamento após o tratamento com droga. Com o uso de 1 μ M foi observada uma redução de 55%, o tratamento com 5 μ M reduziu as taxas de encistamento em 64% e 10 μ M resultaram em uma redução de 86%, denotando um efeito dose-dependente. Após o teste estatístico One Way Anova, foi observada que a redução em relação ao controle é significativa para todas as concentrações da droga.

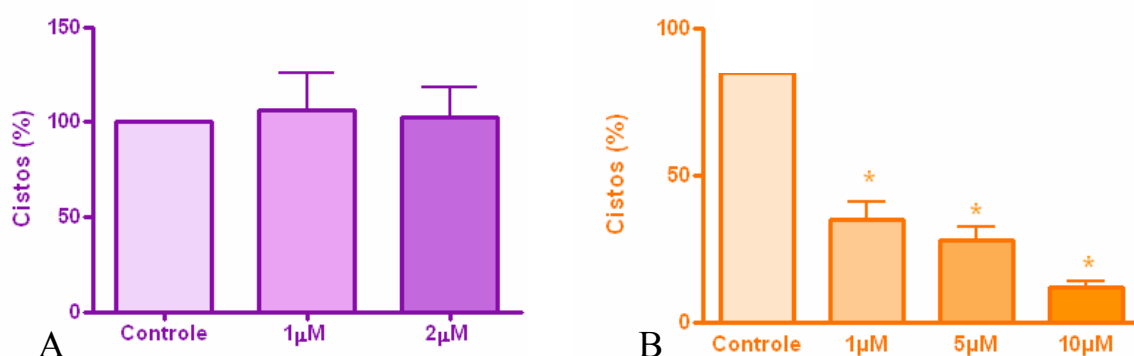


Figura 2- Efeito de inibidores de PI3K no encistamento de *G. lamblia*. Parasitos crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas foram transferidos para o meio de encistamento na presença de concentrações variadas de Wortmanina (A) ou LY294002 (B) e recolhidos após 48 horas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O teste One Way Anova mostrou que a diferença em relação ao controle não é significativa ($p > 0,05$).

Para avaliar o papel da PKC no encistamento, os parasitas foram tratados com 1, 2, 3, 4 e 5 μM de Staurosporina no momento do estímulo ao encistamento. Como pode ser observado na figura 3, não há diferença significativa entre o controle e as amostras tratadas ($p > 0,05$).

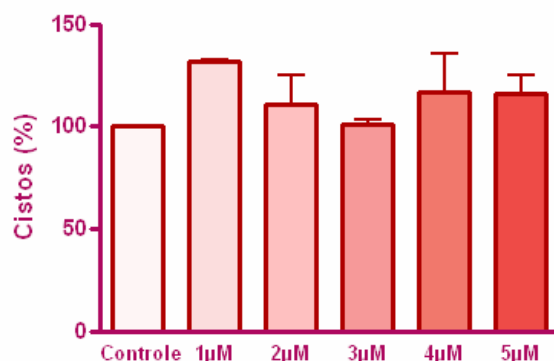


Figura 3- Efeito da inibição da atividade de PKC no encistamento de *G. lamblia*. Parasitas crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas, transferidos para o meio de encistamento na presença de concentrações variadas de Staurosporina e recolhidos após 48 horas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O teste One Way Anova mostrou que a diferença em relação ao controle não é significativa ($p > 0,05$).

Para avaliar a importância da tirosina cinase no encistamento os parasitas foram tratados com 10, 20 e 50 μM de Genisteína no momento do estímulo ao encistamento. Como pode ser observado na figura 4, houve uma significativa redução no encistamento após o tratamento com Genisteína. Com o uso de 10 μM foi observada uma redução de 46%, o tratamento com 20 μM reduziu as taxas de encistamento em 54% e 50 μM resultaram em uma redução de 83%, denotando um efeito dose-dependente da droga. Após o teste estatístico One Way Anova, foi observada que a redução em relação ao controle é significativa para todas as concentrações da droga ($p < 0,05$).

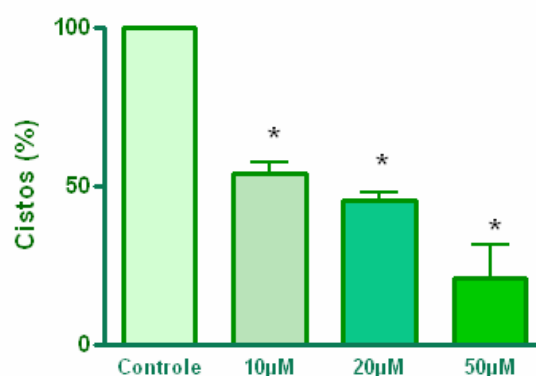


Figura 4- Efeito da inibição da atividade tirosina-cinase no encistamento de *G. lamblia*. Parasitas crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas, transferidos para o meio de encistamento na presença de concentrações variadas de Genisteína e recolhidos após

48 horas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O teste One Way Anova mostrou que a diferença em relação ao controle e entre as concentrações utilizadas é significativa ($p < 0,05$).

Para que somente os efeitos da droga fossem avaliados, uma curva de encistamento foi feita apenas na presença do diluente das drogas: DMSO. Em concentrações de até 0,3% não foi detectada diferença significativa nas taxas de encistamento. Contudo, a concentração padrão de DMSO em todos os experimentos foi de 0,1% (figura 5).

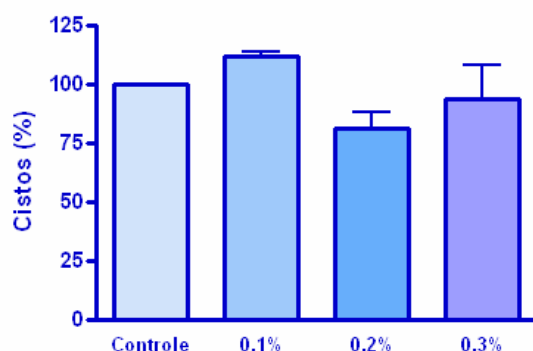


Figura 5- Efeito do DMSO sobre o encistamento de *G. lamblia*. Parasitos crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas, transferidos para o meio de encistamento na presença de concentrações variadas de DMSO e recolhidos após 48 horas. As concentrações de DMSO refletem aquelas alcançadas na diluição dos diferentes inibidores de cinases e fosfatases utilizados neste estudo. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. O teste One Way Anova mostrou que a diferença em relação ao controle não é significativa ($p > 0,05$).

5.1.2 Inibidor de fosfatases

Para avaliar a participação de fosfatases no encistamento, os parasitas foram tratados com 1; 2,5; 5; 10 e 50nM de ácido okadaico no momento do estímulo ao encistamento. Como pode ser observado na figura 6, não há diferença significativa entre o controle e as amostras tratadas ($p > 0,05$).

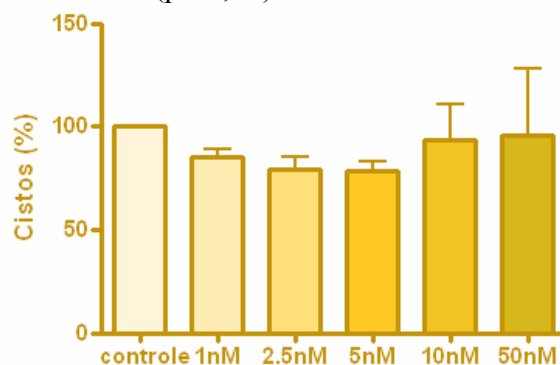


Figura 6- Efeito da inibição de fosfatases sobre o encistamento de *G. lamblia*. Parasitos crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas, transferidos para o meio de encistamento na presença de concentrações variadas de ácido okadaico e recolhidos após 48 horas. O teste One Way Anova mostrou que a diferença em relação ao controle não é significativa ($p>0,05$)

5.1.3 Inibidor de proteassoma

Para avaliar a importância dos proteassomas no encistamento, os parasitas foram tratados com 1, 5, 10 μM de clastolactacistina- β -lactona no momento do estímulo ao encistamento. Como pode ser observado na figura 7, não há diferença significativa entre o controle e as amostras tratadas ($p>0,05$).

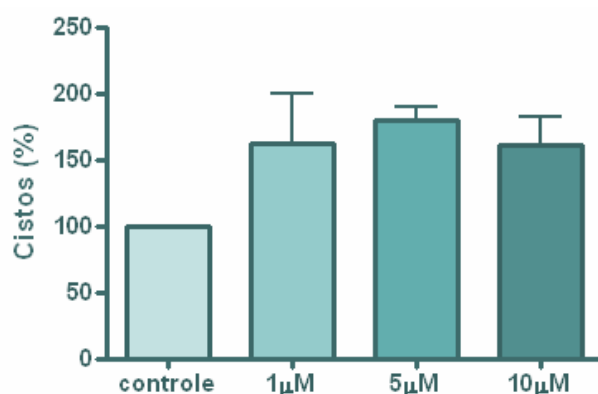


Figura 7- Efeito da inibição de proteassomas sobre o encistamento de *G. lamblia*. Parasitos crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas, transferidos para o meio de encistamento na presença de concentrações variadas de clastolactacistina- β -lactona e recolhidos após 48 horas. O teste One Way Anova mostrou que a diferença em relação ao controle não é significativa ($p>0,05$)

5.2 ADIÇÃO DE INIBIDORES DE CINASES EM DIFERENTES TEMPOS APÓS O ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO

Para avaliar em quais pontos do encistamento estão atuando os inibidores de cinases o processo de encistamento foi disparado e as drogas adicionadas em momentos chaves do processo de encistamento. Em 6 horas, quando há a formação de fendas que mais tarde serão preenchidas pelo material que forma a parede cística e em 18 horas, quando há a liberação do conteúdo das vesículas de encistamento (Lanfredi-Rangel *et al*, 2003). Com isso houve uma inibição maior quando a Genisteína é adicionada no momento do estímulo ao encistamento (83%). Já no caso do LY294002 a maior porcentagem de inibição (97%) foi obtida quando a droga era adicionada 6 horas após o estímulo ao encistamento (Figura 8).

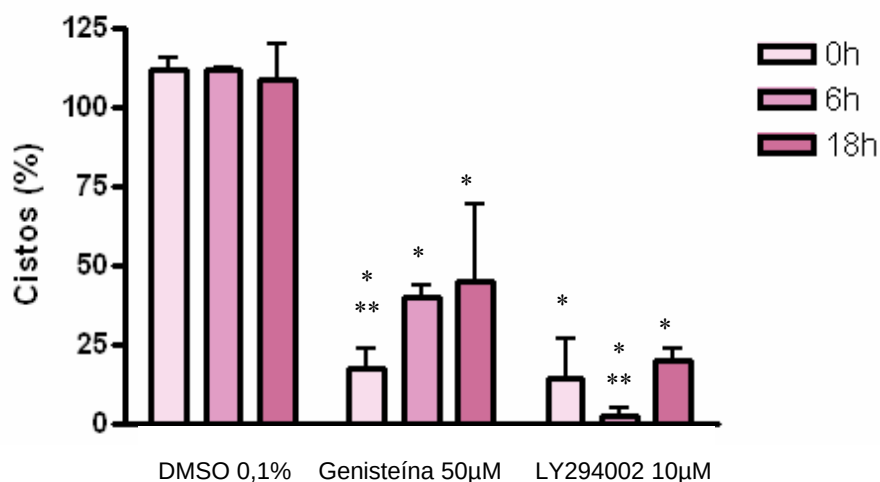


Figura 8- Efeito de inibidores de cinases em diferentes tempos do encistamento de *G. lamblia*. Parasitos foram crescidos em meio de pré-encistamento por 48 horas, e separados em três grupos. O primeiro foi transferido para o meio de encistamento na presença de 50µM de Genisteína ou 10µM de LY294002 e recolhidos após 48 horas. O segundo foi transferido para o meio de encistamento, no qual, 6 horas depois foi acrescentado 50µM de Genisteína ou 10µM de LY294002 e recolhido após 42 horas, totalizando 48 horas de encistamento. O terceiro foi transferido para o meio de encistamento, no qual, 18 horas depois foi acrescentado 50µM de Genisteína ou 10µM de LY294002 e recolhido após 30 horas, totalizando 48 horas de encistamento. O teste mostrou que a adição de 10µM de LY294002 após 6 horas de estímulo ao encistamento resultou em uma maior inibição do encistamento de *G. lamblia*. Já no caso da Genisteína, a adição de 50µM após 6 ou 18 horas resultou em uma inibição menos eficiente do encistamento do parasita. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. (*) indica diferença significativa em relação ao controle. (**) indica diferença significativa em relação aos outros tempos de adição da mesma droga. Para os casos (*) e (**) $p < 0,05$, após o teste One Way Anova.

5.3 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *G. lamblia*

Para avaliar a influência das drogas inibidoras do encistamento no crescimento, o parasita foi crescido em meio TYI-S-33 modificado e após 48 horas foram adicionadas às drogas que provocaram inibição do encistamento: LY294002 (inibidor de PI3K) e Genisteína (inibidor de tirosina cinase). Neste experimento podemos observar que o tratamento com Genisteína não resultou em significativa redução do crescimento ($p > 0,05$). Contudo, o crescimento de *G. lamblia* é bastante suscetível ao LY294002, que chega a inibir 85% da proliferação em 48 horas, na concentração de 10µM (Figura 9).

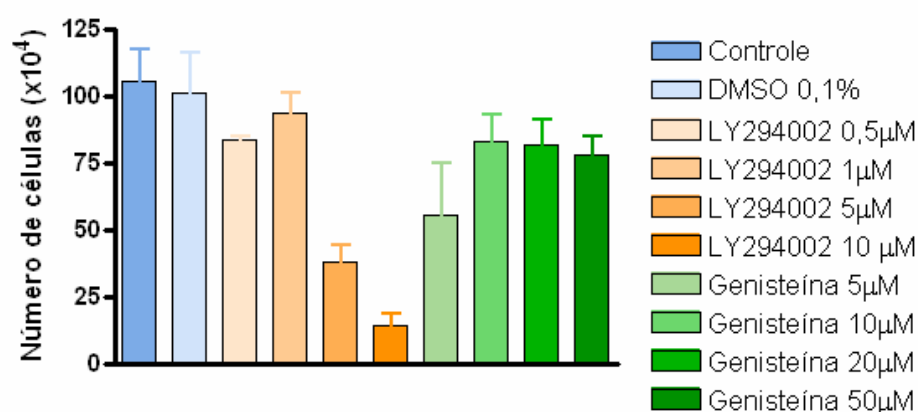


Figura 9- Efeito de inibidores de PI3K e Tirosina cinases no crescimento de *G. lamblia*. Parasitos foram crescidos em meio TYI-S-33 por 48 horas, quando diversas concentrações de Genisteína ou LY294002 foram acrescentadas. Os parasitos foram recolhidos após 48 horas. O teste One Way Anova mostrou que a inibição do crescimento foi significativa em relação ao controle no caso de 5 e 10µM de LY294002.

5.4 MUDANÇA DE EXPRESSÃO DE CWP-2 APÓS TRATAMENTO COM LY294002 E GENISTEÍNA

Dentre as atividades celulares disparadas com o encistamento está a produção das proteínas de parede cística. A inibição do encistamento de *G. lamblia* pelas drogas utilizadas pode estar alterando diversos processos que levam à diferenciação. Para avaliar se a produção da CWP2 era alterada foi feito SDS-page de amostras controle estimuladas ao encistamento por 48 horas e tratadas com Genisteína 50µM, LY294002 10µM e DMSO 0,01% no momento da indução do encistamento e recolhidas após 48 horas. A detecção de CWP2 da amostra tratada com DMSO não é muito diferente do controle, mostrando que não há uma grande mudança da expressão de CWP2 após o tratamento. Já com o tratamento com Genisteína, a marcação se apresenta bastante diminuída, mostrando redução da expressão da proteína. Isso indica uma influência da tirosina cinase na regulação da produção de CWP2. O tratamento com o inibidor de PI3K, LY294002, não resultou em significativa diminuição da detecção, mostrando que

apesar de influenciar na regulação da expressão das proteínas de parede cística, a PI3K não parece ter um papel tão fundamental quanto a tirosina cinase(figura 10).

Figura 10 – Efeito de inibidores de PI3K (LY294002) e tirosina cinase (Genisteína) na expressão de CWP2 em *G. lamblia*. Parasitos estimulados ao encistamento por 48 horas na situação controle (1), na presença de 0,1% de DMSO (2), na presença de 50µM de Genisteína (3), e na presença de 10µM de LY294002 foram processados para detecção de CWP2 por western blotting. 30µg de proteína foram aplicados em cada poço do gel.

5.5 DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA DE PAREDE CÍSTICA 2 NO ENCISTAMENTO

Usando microscopia de fluorescência e um anticorpo contra CWP2, foi possível observar a distribuição desta proteína em volta do parasita, após indução ao encistamento por 48 horas. Também é possível observar uma distribuição da proteína no flagelo remanescente e na bolsa membranosa em sua base (figura 11). Assim como foi observado por microscopia de varredura de alta resolução, a bolsa membranosa e o flagelo parecem estar cobertos pelo material fibrilar que forma a parede cística. Após a verificação de que a Genisteína inibia a produção de CWP2, foi feita uma imunofluorescência, para avaliar se o tratamento com LY294002 e Genisteína era capaz de mudar o padrão de distribuição de CWP2. Na figura 12 podemos observar a imunofluorescência de parasitas tratados com 10 μ M de LY294002 no momento do encistamento e recolhidos após 48 de estímulo. As vesículas de encistamento parecem estar cobertas de CWP2 e não há diferença da distribuição do antígeno na célula. O mesmo acontece durante o tratamento com 50 μ M de Genisteína. Não é possível observar uma diferença em relação ao controle (figura 13).

Figura 11 – Localização de CWP2 por microscopia de fluorescência de parasitas induzidos ao encistamento em situação controle. Em (A) é possível observar a distribuição desta proteína em volta do parasito, após indução ao encistamento por 48 horas. Também é possível observar uma distribuição da proteína no flagelo remanescente (seta rosa). Podemos observar a distribuição de CWP2 nas vesículas de encistamento (cabeça de seta azul) e mais fracamente em um cisto com a parede cística ainda em formação (cabeça de seta lilás). Em (B) cabeças de seta pretas apontam flagelos, setas pretas apontam parede cística, (*) apontam vesículas de encistamento.

Figura 12 – Localização de CWP2 por microscopia de fluorescência em parasitos estimulados ao encistamento por 48 horas na presença de 10 μ M de LY294002. Embora não seja comum observarmos cistos, já que há uma grande inibição do encistamento, podemos observar parasitos em encistamento em que a marcação das VEEs é muito semelhante àquela encontrada no controle (figura 11). Em (A) cabeças de seta azuis indicam vesículas de encistamento. Em (B) cabeças de seta pretas indicam flagelos e DV indica disco ventral.

Figura 13 – Localização de CWP2 por microscopia de fluorescência em parasitas estimulados ao encistamento por 48 horas na presença de 50 μ M de Genisteína. (A) Não é possível observar uma diferença na distribuição da proteína entre o parasita tratado e o controle (figura 11). Cabeças de seta azuis indicam vesículas de encistamento. Cabeças de seta pretas indicam flagelo.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DO ENCISTAMENTO DE *G. lamblia*

Para avaliar o padrão de mudanças morfológicas observadas durante o processo de encistamento de *G. lamblia* nós induzimos o encistamento do parasito como descrito anteriormente e recolhemos as células após 12, 18, 24, 48 horas de estímulo ao encistamento. As observações por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução revelaram profundas mudanças morfológicas. A figura 14a mostra o parasito em um estágio inicial de encistamento, 12 horas após o estímulo. Neste ponto pequenas protrusões na membrana podem ser observadas distribuídas por toda a superfície dorsal do parasito. Após 18 horas de encistamento, as protrusões na membrana, que provavelmente correspondem às vesículas de encistamento (VEEs), são mais proeminentes. A porção caudal do corpo celular se apresenta reduzida, enquanto a anterior está arredondada (figura 14b). 24 horas após o estímulo ao encistamento grandes protrusões de membrana podem ser vistas na superfície do parasito, que provavelmente também correspondem a VEEs (figura 14c). Também após 24 horas de estímulo ao encistamento, a porção caudal do corpo celular está quase completamente retraída, a porção anterior está ainda mais arredondada e os flagelos são vistos emergindo da superfície dorsal da célula. (figura 14d). Em parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas, o material filamentososo que forma a parede pode ser observado cobrindo completamente a superfície celular. É possível observar também um flagelo remanescente com uma bolsa fibrilar em sua base. Este flagelo também se apresenta coberto por material fibrilar (figura 14e). 48 horas após o estímulo ao encistamento também é possível observar cistos completos, em que o material fibrilar formador da parede cística pode ser vista cobrindo toda a superfície do parasito (figura 14f). A microscopia eletrônica de transmissão de cistos e trofozoítas em encistamento mostrou as estruturas típicas (figura 15). Vesículas de encistamento podem ser observadas em parasitos que ainda estão no início do processo de diferenciação (figura 15a). A parede cística pode ser bem observada, bem como a membrana do cisto (figuras 15b, 15c). Na figura 20D é possível observar o disco ventral fragmentado no interior do cisto em formação. Elementos da parede cística podem ser vistos no exterior da célula, no que parece ser o começo da montagem da parede cística (figura 15d). Os parasitos tratados com DMSO se apresentaram com a mesma morfologia daquela encontrada no controle (figura 16a ,16b)

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura de parasitos induzidos ao encistamento por 12, 18, 24 e 48 horas. A – Parasito 12 horas após indução do encistamento. Superfície apresenta discretas protrusões. B – Parasito 18 horas após indução do encistamento. Protrusões de membrana, provavelmente VEEs (setas pretas), e arredondamento da parte anterior e podem ser observados. C – trofozoíta 18 horas após indução do encistamento. Protrusões maiores de membrana, que provavelmente correspondem a VEEs estão presentes (cabeças de seta verdes). D – 48 horas após o estímulo ao encistamento o parasito se apresenta arredondado e parece haver uma gradual diminuição do comprimento dos flagelos (cabeça de setas pretas), um processo que parece ocorrer da extremidade distal em direção ao corpo celular. E – pré-cisto presente em amostra que foi induzida ao encistamento por 48 horas. É possível observar um flagelo remanescente coberto por material fibrilar e com uma bolsa membranosa em sua base (cabeça de seta lilás). F – cisto completamente formado em que o material fibrilar formador da parede cística pode ser observado.

Figura 15 - Microscopia eletrônica de transmissão de parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas. A – parasito em processo de encistamento. VEE indica vesícula de encistamento. Cabeças de seta indicam vesículas periféricas. Barra: 1µm. B – Parasito em processo de encistamento, com vesícula de encistamento (VEE) chegando na superfície (barra 1,1µm). Detalhe pode ser visto em C (barra 0,4µm). Em ambas as figuras VEE indica vesícula de encistamento e cabeças de seta indicam vesículas periféricas. D – Detalhe de um cisto. Membrana é indicada por seta larga, vesícula periférica é indicada por cabeça de seta e parede cística, por PC. Barra 0,5µm. E – cistos completamente formados. PC indica parede cística e seta larga indica membrana do cisto. Barra: 2µm. D – cisto em formação, onde pode ser observada a fragmentação do disco adesivo, característica da formação de cistos de *Giardia lamblia*. Setas finas indicam material da parede cística, que ainda não está formada. DV indica disco ventral. Em todos (!) indica grânulos de glicogênio. Barra: 2µm.

Figura 16 – Microscopia eletrônica de transmissão de parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 0,1% de DMSO. A e B – Cistos completamente formados. PC indica a parede cística e setas indicam membrana do cisto. Em todos (!) indica grânulos de glicogênio. Barras: 2 μ m

5.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO EFEITO DOS INIBIDORES EFETIVOS DO ENCISTAMENTO

5.7.1 Microscopia ótica

Para uma avaliação geral dos efeitos dos inibidores das diferentes cinases e fosfatases previamente citados sobre o encistamento, o mesmo material usado para contagem da porcentagem de cistos foi observado em contraste interferencial diferencial de Normarsky (DIC). O controle apresentou morfologia típica (figura 17). Em relação às amostras tratadas com 50 μ M de Genisteína, pudemos com bastante frequência observar várias células no meio do processo de divisão (figura 18), sugerindo que a Genisteína possa estar tornando este processo mais lento, fazendo com que fosse mais frequentemente observado. As amostras tratadas com 50 μ M de LY294002 apresentaram superfície repleta de pequenas protruções (figura 19), sugerindo aumento do número de vesículas periféricas.

5.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão

5.7.2.1 Genisteína

Para melhor compreensão do efeito inibitório da Genisteína, o material tratado foi observado por microscopia eletrônica de transmissão. Uma desorganização do sistema endomembranar interno foi encontrada, formando estruturas membranosas concêntricas (figura 20a, 20c e, em maior aumento, 20d). Contudo, o citoplasma das células tratadas era aparentemente idêntico ao do controle. Na figura 20a também observamos uma vesícula contendo material eletrólucido, além de um perfil de membrana desorganizado.

É possível também observar uma desorganização do disco ventral, que no trofozoíta em processo de encistamento (contudo, ainda sem parede cística) pode ser visto fragmentado em todo o citoplasma (figuras 20b e 21a). Isto não acontece no parasita não tratado, em que a desorganização do disco ventral é observada apenas quando o parasita já está na forma cística.

Também é possível observar os efeitos em relação à divisão celular. Na figura 21b este efeito fica claro, quando a porção do corpo celular contendo dois núcleos é observada pronunciando-se à frente do disco adesivo voltado para direita. E o terceiro núcleo está localizado entre os dois discos adesivos, onde os dois núcleos antes descritos seriam usualmente encontrados.

Além destes efeitos, em menor grau, também há desorganização das vesículas periféricas. Enquanto no controle as vesículas periféricas aparecem em seu maior eixo, paralelas à membrana em apenas uma linha, após o tratamento com 50 μ M de Genisteína as vesículas aparecem perpendiculares à membrana e organizadas em mais de uma fileira (figura 20c).

5.7.2.2 LY294002

Para conhecer os efeitos ultraestruturais causados pelo tratamento de *G. lamblia* com 10 μ M do inibidor de PI3K, LY294002, os parasitas tratados foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. O efeito mais evidente foi a intensa desorganização das vesículas periféricas. Além de perderem sua usual organização paralela à membrana plasmática, estas vesículas podem ser vistas espalhadas por todo o citoplasma, inclusive próximas ao núcleo e às vesículas de encistamento (figuras 22a e 23a). Algumas destas vesículas possuem perfis de membrana em seu interior, sugerindo uma desorganização do sistema endo-lisossomal, além de uma desorganização membranar. Estruturas similares a figuras de mielina menos organizadas também foram encontradas, similares àquelas vistas durante o tratamento com Genisteína, contudo, estas membranas se apresentavam mais frouxas, formando uma grande vesícula contendo diversos perfis de membrana (figura 23b).

5.8 EFEITO DO INIBIDOR DE PI3K NA CAPACIDADE ENDOCÍTICA DE *Giardia lamblia*

Quando se observam as micrografias eletrônicas de parasitas tratados com 10 μ M de LY294002, nota-se claramente a desorganização das vesículas periféricas, o que poderia significar uma desorganização do sistema endo-lisossomal. Para testar esta hipótese foi utilizado o Lucifer Yellow, uma substância fluorescente que entra nas células por endocitose. Parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas na presença ou não do inibidor de cinase foram observadas por microscopia de fluorescência após ensaio de endocitose. Nas células controle uma marcação pontual foi observada, consistente com as descrições de vesículas periféricas (figuras 24a e 24b). Nas células tratadas a marcação se apresenta similar ao controle (figuras 24c e 24d), mostrando que não parece haver uma mudança na capacidade endocítica.

Figura 17- Microscopia óptica de contraste interferencial diferencial de Normarsky (DIC) de parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas, utilizando-se o meio normal de encistamento. Setas mostram parede cística.

Figura 18- Microscopia óptica de contraste interferencial diferencial de Normarsky(DIC) de parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 50 μ M de Genisteína. Diversas células em processo de divisão foram observadas.

Figura 19- Microscopia óptica de contraste interferencial diferencial de Normarsky (DIC) de parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 10 μ M de LY294002. Diversas células apresentaram superfície repleta de pequenas protrusões (setas).

Figura 20 – Microscopia eletrônica de transmissão de parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 50 μ M de Genisteína. A – parasito com desorganização interna das membranas, formando figuras concêntricas. Barra 2 μ m. B – Parasita apresenta desorganização interna das membranas e desorganização do disco ventral. Barra: 5 μ m. C – Parasito apresenta diversas figuras de mielina menos organizadas, além de leve desorganização das vesículas periféricas. Barra: 2 μ m. D – maior aumento mostrando desorganização membranar. Em todos (!) indica grânulos de glicogênio. Barra: 2 μ m.

Figura 21 – Microscopia eletrônica de transmissão de parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 50 μ M de Genisteína. A – Parasito com desorganização do disco ventral, em que esta estrutura pode ser observada dentro de grandes vesículas (+). Barra 2 μ m. B – parasito apresentando 3 núcleos e 2 discos ventrais. Posições não consistentes com divisão celular normal. Barra: 5 μ m. Em todas as figuras: N indica núcelo, DV indica disco ventral, setas indicam vesículas periféricas, F indica flagelo, (*) indica figuras concêntricas de membrana, (+) indica vesícula contendo fragmento de disco ventral, (!) indica grânulos de glicogênio.

Figura 22 – Microscopia eletrônica de transmissão de parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 10 μ M de LY294002. A – parasito maior do que o normal, em que podem ser observadas figuras membranosas concêntricas. Há também intensa desorganização das vesículas periféricas. VP indica vesículas periféricas, F indica flagelos, RE indica retículo endoplasmático, DV indica disco ventral, (*) indica figura concêntrica membranar, (!) indica grânulos de glicogênio. Barra: 5 μ m.

Figura 23 – Microscopia eletrônica de transmissão de parasitas induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de 10 μ M de LY294002. A – dramática desorganização das vesículas periféricas. Barra: 2 μ m. B – desorganização de vesículas periféricas, que aparecem perpendiculares à membrana. Barra: 2 μ m. Em todas as figuras: VP indica vesículas periféricas, F indica flagelos, RE indica retículo endoplasmático, DV indica disco ventral, (*) indica figura concêntrica membranar, (!) indica grânulos de glicogênio.

Figura 24 – A e B – Parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas e, posteriormente incubados com LúCIFer Yellow. A – Setas apontam acúmulo de material fluorescente, correspondente ao traçador endocitado. B – (*) indicam vesículas de encistamento. C e D – Parasitos induzidos ao encistamento por 48 horas na presença de LY294002 e, posteriormente incubados com LúCIFer Yellow. C – Setas apontam acúmulo de material fluorescente, correspondente ao traçador endocitado. D – (*) indicam vesículas de encistamento.

6. DISCUSSÃO

6.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

A evidente inibição do crescimento de *G. lamblia* por 10 μ M de LY294002 mostra que a PI3K atua também sobre a proliferação deste parasito. Contudo não observamos parasitos no meio do processo de divisão, sugerindo que a citocinese não é regulada por esta cinase. Martinez-Gac e colaboradores (2004) apontam a PI3K como uma molécula indispensável para sinalizar a entrada no ciclo celular, o que corrobora os dados de prejuízo à divisão celular com o uso de LY294002. Cox e colaboradores (2006) trataram trofozoítas de *G. lamblia* com LY294002 por 48h e também observaram grande inibição do crescimento, contudo a curva de crescimento durava apenas 48 horas, e a droga era adicionada nas concentrações de 25 a 200 μ M, no momento do inóculo. Com isso sugere-se fortemente que a PI3K, além de estar presente em *G. lamblia*, esteja participando da regulação da divisão celular. A PI3K pode disparar diversos sinais mitogênicos (Krasinilkov, 2000). Parece então claro que a inibição da PI3K pode levar à diminuição do crescimento.

O tratamento com 50 μ M de Genisteína não inibiu o crescimento de *G. lamblia*. Já em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, apenas 5 μ M da droga resultaram em significativa diminuição do crescimento (Braga e De Souza, 2006). A tirosina cinase pode não ser uma molécula tão fundamental para a regulação da divisão celular em *G. lamblia*, ou a quantidade de inibidor utilizada não foi suficiente para impedir a ação desta cinase. Parece divergente que o efeito do inibidor de cinases de tirosina não tenha um efeito tão claro, já que a via da PI3K está *downstream* da via da tirosina cinase (Sebolt-Leopold e English, 2006). Contudo, pode ocorrer uma reorganização da cascata de sinalização e a atividade diminuída da tirosina cinase pode resultar em um aumento da expressão de outra molécula, compensando esta inibição. Além disto, a adição da droga na fase Log poderia modificar o efeito da mesma.

6.2 AÇÃO DE INIBIDORES SOBRE O ENCISTAMENTO

Todas as drogas usadas, com exceção da clastolactacistina- β -lactona, foram diluídas em DMSO. Para garantir que os efeitos observados provinham da ação da droga e não do seu diluente, foi necessário fazer uma avaliação do efeito do DMSO sobre as taxas de encistamento. O uso de até 0,3% de DMSO não alterou significativamente as taxas de encistamento, demonstrando que os possíveis efeitos das

drogas a serem testadas seriam realmente fruto de sua ação. Em todos os experimentos posteriores o DMSO foi usado em concentração que não ultrapassou 0,1%. A microscopia ótica revelou uma morfologia dos cistos compatível com o controle.

O tratamento com Genisteína reduziu drasticamente as taxas de encistamento. Como esta droga é um inibidor amplo das cinases de tirosina, que é uma família grande e variada de cinases, podemos afirmar que estas enzimas participam da sinalização que leva ao encistamento. Outros grupos já haviam observado a importância da família das cinases de tirosina na diferenciação. Kuhn e Wiese (2005) sugeriram que uma MAP cinase (uma enzima que atua em conjunto à família das cinases de tirosina) pudesse estar regulando a diferenciação de *Leishmania mexicana*. Em trabalho recente, Daoud e colaboradores (2006) demonstraram que a Genisteína inibia a diferenciação de trofoblastos humanos em sincício, mostrando que as cinases de tirosina possuem um importante papel na diferenciação dos tecidos. Isto indica que mudanças externas podem ser traduzidas em mudanças de comportamento internas com a “tradução” de cinases de tirosina. Em *G. lamblia* as cinases de tirosina parecem ter um papel importante na diferenciação do parasito.

O tratamento com Wortmanina não resultou em redução significativa da taxa de encistamento, inclusive utilizando doses micromolares do inibidor. Contudo, Makioka e colaboradores (2001b) obtiveram notória redução do encistamento de *E. invadens* após tratamento com wortmanina. Cox e colaboradores (2006) em seu artigo sobre a descoberta de duas putativas PI3K em *G. lamblia* (*Gipi3k1* e *Gipi3k2*) comentaram sobre a sua falta de sucesso na redução das taxas de crescimento pela Wortmanina. Esse composto se liga covalentemente ao sítio de ligação com o ATP da PI3K, tirando a capacidade da enzima de transferir um grupamento fosfato para o fosfatidilinositol (Walker *et al*, 2000). Contudo a análise do cDNA da PI3K de *Giardia* mostrou uma grande inserção de aminoácidos exatamente no sítio de ligação da proteína com o ATP (Cox *et al*, 2006). Esta inserção pode ter afetado o posicionamento dos aminoácidos em que a Wortmanina se liga, o que poderia explicar a ineficiência desta droga em impedir o crescimento e diferenciação de *G. lamblia*.

Já a utilização de um outro inibidor de PI3K, o LY294002, mostrou ser bastante eficaz na diminuição nos níveis de encistamento na concentração de 10µM. Este resultado é corroborado pelos trabalhos de Cox e colaboradores (2006) e Hernandez e colaboradores (2007), em que a existência de PI3K em *G. lamblia* já foi apontada. Além disto, parece haver um aumento da expressão desta proteína durante o encistamento,

sugerindo fortemente a participação desta cinase na transdução de sinal que leva à diferenciação. A PI3K é comumente ativada pela tirosina cinase (Sebolt-Leopold e English, 2006) e ambas parecem estar envolvidas nas vias de sinalização que levam ao encistamento de *G. lamblia*.

A adição de Staurosporina no momento da indução ao encistamento não resultou em significativa redução da taxa de encistamento de *G. lamblia*. Contudo Bazan-Tejeda e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento com outros inibidores de PKC como bisindolilmaleimida-I, Cloreto de Queleritrina e Calfofostina C resultou em diminuição de até 40% da taxa de encistamento em relação ao controle. Em *E. invadens*, Makioka e colaboradores (2000c; 2000d) mostraram a importância da PKC para a diferenciação utilizando diversos inibidores da proteína cinase C (inclusive a Staurosporina). Quando este resultado é observado, é possível perceber que a PKC parece participar da diferenciação não só de *G. lamblia*, mas também de outros protozoários. Contudo, ineficiência da inibição do encistamento pela Staurosporina e pelo ácido okadaico não pode ser considerada surpreendente. A divergência entre este parasita e as células de mamíferos, onde este inibidor foi inicialmente utilizado (Tamaoki *et al*, 1986) é muito grande, o que pode significar que ela não atue na PKC de *G. lamblia*.

O uso do ácido okadaico não inibiu o encistamento de *G. lamblia*. Contudo, recentemente, Lauwaet e colaboradores (2007) sequenciaram uma fosfatase do tipo 2A em *G. lamblia*. Utilizando RNAi, este grupo demonstrou que esta enzima era importante para o encistamento do parasita, já que a diminuição da expressão da fosfatase 2A inibiu a formação das vesículas de encistamento.

O tratamento com clastolactacistina- β -lactona não causou uma diminuição significativa da taxa de encistamento de *G. lamblia*. Gonzalez e colaboradores (1999) observaram que a lactacistina (forma não aquosa da clastolactacistina- β -lactona) foi capaz de inibir completamente o encistamento de *Entamoeba invadens* na concentração de 10 μ M. Makioka e colaboradores (2002) mostraram que a clastolactacistina- β -lactona foi o inibidor mais potente do encistamento de *E. invadens*. Entretanto, não foi observado efeito inibitório em *G. lamblia*. Stefanic e colaboradores (2006) já apontavam a ineficiência do bloqueio do encistamento pela lactacistina. Contudo, neste mesmo trabalho, Stefanic e colaboradores apontam a migração de proteossomas para as

ESVs, sugerindo que estes possam ter um papel importante na formação da parede cística.

A grande divergência deste parasito em relação aos outros eucariotos (Keeling, 2007) pode explicar estes fenômenos. Assim como a actina (Drouin *et al*, 1995), a PKC, as fosfatases de proteína e os proteassomas de *G. lamblia* podem ser bastante divergentes daqueles de outros seres eucarióticos. Isto modificaria a susceptibilidade deste parasito às drogas usadas como inibidores destas moléculas e estruturas, o que explicaria a ineficiência no uso de determinados inibidores em *G. lamblia*.

6.3 ADIÇÃO DOS INIBIDORES EM DIFERENTES TEMPOS APÓS O ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO

Quando o LY294002 foi adicionado após seis horas de encistamento pudemos observar uma grande inibição da diferenciação, que foi superior ao observado quanto a droga foi adicionada no momento do estímulo ou 18 horas depois. Seis horas após o estímulo para diferenciação, Lanfredi-Rangel e colaboradores (2003) descreveram a presença abundante de fendas, que posteriormente seriam preenchidas por material formador da parede cística. Ou seja: nesta etapa ocorreria o começo do transporte dos açúcares e proteínas da parede. Isto sugere uma participação mais efetiva da PI3K durante a fase inicial deste transporte, possivelmente durante a formação das fendas. Após 18 horas de encistamento, o material formador da parede cística está sendo exocitado e há fusão das VEEs com a membrana externa (Lanfredi Rangel, 2002; Lujan *et al*, 1997). Aparentemente este processo não tem uma regulação tão dependente de PI3K quanto a formação das fendas, contudo, a alta taxa de inibição, mesmo quando a droga é adicionada 18 horas após o estímulo para o encistamento, sugere que os fenômenos que ocorrem durante esta etapa também sejam, de certa forma regulados pela PI3K, ou alguma molécula sinalizadora *downstream* desta via.

O tratamento com Genisteína em diferentes tempos após o estímulo ao encistamento produziu efeitos diferentes. Quando o inibidor era adicionado no momento do estímulo ao encistamento, a taxa de encistamento diminuiu mais do que quando a droga foi adicionada seis horas após o estímulo à diferenciação. A adição do inibidor seis ou 18 horas após o estímulo ao encistamento suscitou uma mudança menor da taxa de diferenciação. Contudo, não há diferença significativa entre adicionar a droga seis ou 18 horas após o estímulo ao encistamento. Ao contrário do que aconteceu com o tratamento com LY294002, a etapa do encistamento mais prejudicada pela ação da

Genisteína foi a inicial. É possível que a própria ativação dos genes específicos do encistamento esteja sendo prejudicada, contudo estudos mais detalhados sobre o comportamento da maquinaria nuclear durante a ação dos inibidores são necessários para melhor avaliar sua ação na diferenciação.

6.4 PRODUÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE CWP2 EM PARASITAS TRATADOS COM GENISTEÍNA E LY294002 NO MOMENTO DO ESTÍMULO AO ENCISTAMENTO

O *western blotting* indicou a diminuição da produção de CWP2 quando o parasita era tratado com Genisteína no momento do encistamento. Contudo, a produção de CWP2 não parece ser afetada por LY294002. Nuckolls e colaboradores (1996) observaram que, em *Dictyostelium discoideum*, a perda da funcionalidade do gene *splA* (que codifica uma proteína tirosina cinase) promoveu a lise das *spore cells* antes de completar a diferenciação. Também para este protozoário, a ação da tirosina cinase parece ser essencial para a diferenciação, assim como observado para *G. lamblia*. Apesar do resultado mostrar uma produção de CWP2 normal após tratamento com LY294002, Cox e colaboradores (2006) demonstraram um aumento da expressão de Gipi3k2 durante o encistamento, sugerindo a participação desta cinase na diferenciação. O resultado da contagem de cistos também revelou que a PI3K parece ser essencial durante o encistamento, embora, aparentemente, ela não regule a produção de CWP2.

A partir daí, foi necessário observar a distribuição desta proteína no parasito em encistamento em comparação àqueles tratados com Genisteína ou LY294002. O resultado obtido não sugere uma mudança na distribuição desta proteína durante o encistamento. As VEEs parecem ser do mesmo tamanho e a distribuição é aparentemente a mesma. Os cistos formados possuem a proteína distribuída em toda a extensão da parede. O uso de uma técnica mais precisa, como a imunocitoquímica, é necessária para avaliar se a distribuição desta proteína muda quando o parasita é induzido ao encistamento na presença de Genisteína e LY294002.

6.5 MORFOLOGIA DO ENCISTAMENTO

Durante o encistamento dramáticas mudanças ocorrem em relação ao metabolismo e morfologia dos trofozoítas, que se transformam em cistos, internalizando os flagelos e quebrando o disco adesivo e armazenando-o no citoplasma. A parede

cística é formada por proteínas e açúcar (Mowatt *et al.*, 1995; Luján *et al.*, 1995; Gerwig *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003). As imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura mostraram a deposição de filamentos da parede cística, arredondamento do parasita e presença de um flagelo remanescente (também observado por Erlandsen *et al.*, 1996). Foi também possível observar a deposição de material filamentoso neste flagelo, com a microscopia de fluorescência e marcação com anticorpo contra CWP2, foi constatado que este material que cobre o flagelo possui esta proteína de parede cística em sua composição. Lanfredi-Rangel e colaboradores (2003) propuseram uma sequência em que as etapas do encistamento acontecem. Suas observações por meio de microscopia eletrônica de transmissão mostraram o aparecimento de fendas preenchidas por material eletrondenso após 12 horas de encistamento. Esta observação é consistente com nossos resultados, em que as primeiras protrusões de membrana podem ser observadas.

Elmendorf e colaboradores (2003) já assinalavam a quebra dos flagelos e disco ventral de *G. lamblia* durante a transformação de trofozoíta para cisto. Talvez este remodelamento possa levar ao deslocamento dos axonemas do flagelo, levando às mudanças na posição destes flagelos durante o encistamento, como foi observado em microscopia eletrônica de varredura.

6.6 LY294002 E GENISTEÍNA DESORGANIZAM ESTRUTURAS INTERNAS DE PARASITAS EM ENCISTAMENTO

Após o tratamento com Genisteína diversas “figuras de mielina” foram vistas. Essa desorganização das membranas internas também pôde ser observada por Braga e De Souza (2006). Existem dois tipos de cinases que podem fosforilar resíduos de tirosina em diversas proteínas: os receptores tirosina cinase e as proteínas tirosina cinase (Hubbard e Till, 2000). Estas moléculas são capazes de iniciar diversas vias de sinalização, chegando a ativar não só a PI3K, como outras cinases (Sebolt-Leopold e English, 2006). Por isso, a inibição das cinases de tirosina pode resultar na inibição de diversas vias de sinalização. Em neurônios de camundongos, a utilização de um inibidor de src cinase (um membro da família das cinases de tirosina) inibiu a exocitose das vesículas sinápticas (Baldwin *et al.*, 2006). Analogamente, em *G. lamblia*, poderia estar ocorrendo um impedimento da exocitose, diminuído o encistamento e levando à desorganização membranar observada por MET. Recentemente, Ma e Sayeski (2007) identificaram a tubulina como um substrato para a Jak2 (uma proteína da família das

cinases de tirosina), indicando a interação das cinases de tirosina com o citoesqueleto de microtúbulos. Uma inibição das cinases de tirosina poderia estar desestabilizando o citoesqueleto de *G. lamblia*, levando à desorganização do citoesqueleto observada por MET.

Após o tratamento com LY294002 diversas mudanças ultraestruturais foram observadas nos parasitas tratados. A desorganização das vesículas periféricas foi bastante marcante. Onishi e colaboradores (2007) assinalaram a importância do sistema de sinalização PI3K/Akt para regulação da estabilidade dos microtúbulos nos fibroblastos. Em *G. lamblia*, a diminuição da atividade da PI3K poderia estar comprometendo o citoesqueleto e, assim, a organização interna das organelas. Uma intensa desorganização das membranas também foi observada, assim como aquela encontrada em parasitas tratados com Genisteína, o que pode significar um papel importante da PI3K em *G. lamblia* na manutenção e fusão de membranas, como já foi demonstrado por Davidson (1995) no caso do transporte retrógrado para os lisossomos. Efeitos semelhantes aqueles vistos com tratamento por Genisteína já eram esperados, já que a PI3K é uma cinase *downstream* de alguns subtipos de tirosina cinases (Sebolt-Leopold e English, 2006).

6.7 ENDOCITOSE EM PARASITAS TRATADOS COM LY294002

Micrografias eletrônicas de transmissão de parasitos tratados com LY294002 mostraram uma intensa desorganização das vesículas periféricas, que fazem parte do sistema endo-lisossomal de *G. lamblia* (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1998). Já que a PI3K também regula o transporte para os lisossomos (Davidson, 1995), seria possível que a funcionalidade do sistema endocítico estivesse prejudicada. A fim de investigar esta questão, um ensaio de endocitose foi feito. O marcador escolhido foi o LúCIFer Yellow, que entra na célula por endocitose. O ensaio de endocitose não mostrou considerável diferença entre as células controle (induzidas ao encistamento por 48 horas) e aquelas tratadas com 10 μ M de LY294002 no momento do encistamento (e que permaneceram no meio de encistamento por 48h). Como para que seja feito o ensaio de endocitose é necessário que a célula esteja aderida, pode ser que os parasitas verdadeiramente prejudicados tenham uma menor capacidade de adesão e tenham sido perdidos com a lavagem. Por isso este resultado negativo não é suficiente para mostrar que a capacidade endocítica de *G. lamblia* permanece a mesma após o tratamento com esta droga.

7. CONCLUSÕES

Com base nas observações feitas em microscopias óptica e eletrônica de varredura e de transmissão do processo de encistamento de *G. lamblia*, podemos concluir que:

- O flagelo é a última estrutura de microtúbulos a ser internalizada
- Há deposição de proteínas de parede cística e material formador da parede no flagelo remanescente do cisto de *G. lamblia*
- As cinases de tirosina e a PI3K estão envolvidas na regulação do encistamento
- A cinase de tirosina parece atuar nas etapas iniciais do encistamento e PI3K parece estar envolvida em etapas mais tardias.
- As cinases de tirosina participam da regulação das proteínas de parede cística
- As cinases de tirosina e a PI3K não parecem atuar na distribuição de CWP2
- Durante a fase Log a PI3K parece ser importante para a regulação da proliferação celular
- As cinases de tirosina e a PI3K parecem atuar na organização interna de membranas e citoesqueleto
- A PI3K pode não estar envolvida na endocitose de *G. lamblia*

8. REFERÊNCIAS

- ADAM RD. Biology of *Giardia lamblia*. **Clin Microbiol Rev.** v.14 p.447-475, 2001.
- ABEL ES, DAVIDS BJ, ROBLES LD, LOFLIN CE, GILLIN FD, CHAKRABARTI R. Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem.** v. 276 p.10320-10329, 2001.
- ARISUE N, SANCHEZ LB, WEISS LM, MULLER M, HASHIMOTO T. 2002. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. **Parasitol Int.** v.51 p.9-16, 2002.
- BALDWIN ML, CAMMAROTA M, SIM AT, ROSTAS JA. Src family tyrosine kinases differentially modulate exocytosis from rat brain nerve terminals. **Neurochem Int.** v.49 p.80-86, 2006
- BAZAN-TEJEDA ML, ARGUELLO-GARCIA R, BERMUDEZ-CRUZ RM, ROBLES-FLORES M, ORTEGA-PIERRES G. Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a beta-like molecule during encystment. **Arch Microbiol.** v.187 p.55-66, 2007.
- BENCHIMOL M, PIVA B, CAMPANATI L, DE SOUZA W. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. **J Struct Biol.** v.147 p.102-115, 2004.
- BERNANDER R, PALM JE, SVARD SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cell Microbiol.** v.3 v.55-62, 2001.
- BRADFORD MM A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.72 p.248-254, 1976.
- BRAGA MV, DE SOUZA W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett.** v.256 p.209-216, 2006.
- CALVO-MENDEZ C, VILLAGOMEZ-CASTRO JC, LOPEZ-ROMERO E. Ornithine decarboxylase activity in *Entamoeba invadens*. **Int J Parasitol.** v.23 p.847-852, 1993.

CAMPANATI L, BRE MH, LEVILLIERS N, DE SOUZA W. Expression of tubulin polyglycylation in *Giardia lamblia*. **Biol Cell**. v.91 p.499-506, 1999.

CAMPANATI L, HOLLOSCHI A, TROSTER H, SPRING H, DE SOUZA W, MONTEIRO-LEAL LH. Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoon *Giardia lamblia*. **Cell Motil Cytoskeleton**. v.51 p.213-224, 2002.

CAMPANATI L, TROESTER H, MONTEIRO-LEAL LH, SPRING H, TRENDLENBURG MF, DE SOUZA W. Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. **Histochem Cell Biol**. v.119 p.323-331, 2003.

CARPENTER, C. L., DUCKWORTH, B., AUGER, K., COHEN, B., SCHAFFHAUSEN, B., AND CANTLEY, L. C. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **J Biol Chem**. v.265 p.19704-19711, 1990.

CHANG YM, KUNG HJ, EVANS CP. Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer. **Neoplasia**.v.9 p.90-100, 2007

CHAVEZ-MUNGUIA B, CEDILLO-RIVERA R, MARTINEZ-PALOMO A. The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. **J Eukaryot Microbiol**. v.51 p.220-226, 2004

COX SS, VAN DER GIEZEN M, TARR SJ, CROMPTON MR, TOVAR J. Evidence from bioinformatics, expression and inhibition studies of phosphoinositide-3 kinase signalling in *Giardia intestinalis*. **BMC Microbiol**. v.6 p.45, 2006.

CROSSLEY R, HOLBERTON DV. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **J Cell Sci**. v.59 p.81-103, 1983.

DAOUD G, RASSART E, MASSE A, LAFOND J. Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta. **J Physiol**. v.571 p.537-553, 2006.

DAVIDSON, HW. Wortmannin Causes Mistargeting of Procathepsin D. Evidence for the Involvement of a Phosphatidylinositol 3-Kinase in Vesicular Transport to Lysosomes. **J Cell Biol**. v.130 p.797-805, 1995

DEANE JA, FRUMAN DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. **Annu Rev Immunol**. v.22 p.563-598, 2004.

DROUIN G, MONIZ DE SA M, ZUKER M. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. **J Mol Evol.** v.41 p.841-849, 1995.

ELLIS JG, DAVILA M, CHAKRABARTI R. Potential involvement of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in encystation of a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Stage-specific activation and intracellular localization. **J Biol Chem.** v.278 p.1936-1945, 2003.

ELMENDORF HG, DAWSON SC, MCCAFFERY JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. **Int J Parasitol.** v.33 p.3-28, 2003.

ERLANDSEN SL, BEMRICK WJ, PAWLEY J. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. **J Parasitol.** v.75 p.787-789, 1989.

ERLANDSEN SL, BEMRICK WJ, SCHUPP DE, SHIELDS JM, JARROLL EL, SAUCH JF, PAWLEY JB. High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. **J Histochem Cytochem.** v.38 p.625-632, 1990.

ERLANDSEN SL, MACECHKO PT, VAN KEULEN H, JARROLL EL. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. **J Eukaryot Microbiol.** v.43 p.416-429, 1996.

ERLANDSEN SL, RUSSO AP, TURNER JN. Evidence for adhesive activity of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. **J Eukaryot Microbiol.** v.51 p.73-80, 2004.

EMMERLICH V, SANTARIUS U, BAKKER-GRUNWALD T, SCHOLZE H. Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol** v.100 p.131-134, 1999.

EMMERLICH V, SCHOLZE H, GILLIN FD, BAKKER-GRUNWALD T. Characterization of a proteasome alpha-chain from *Giardia lamblia*. **Parasitol Res.** v.87 p.112-115, 2001.

FEELY DE, SCHOLLMAYER JV, ERLANDSEN SL. *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. **Exp Parasitol.** v.53 p.145-154, 1982.

FRUMAN DA, MEYERS RE, CANTLEY LC. Phosphoinositide kinases. **Annu Rev Biochem.** v.67 p.481-507, 1998.

GERWIG GJ, VAN KUIK JA, LEEFLANG BR, KAMERLING JP, VLIEGENTHART JF, KARR CD, JARROLL EL. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. **Glycobiology.** v.12 p.499-505, 2002.

GHOSH S, FRISARDI M, ROGERS R, SAMUELSON J. How Giardia swim and divide. **Infect Immun.** v.69 p.7866-7872, 2001.

GIBSON C, SCHANEN B, CHAKRABARTI D, CHAKRABARTI R. Functional characterisation of the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase A homologue of *Giardia lamblia*: Differential expression of the regulatory and catalytic subunits during encystation. **Int J Parasitol.** v.36 p.791-799, 2006.

GILLIN FD, REINER DS, GAULT MJ, DOUGLAS H, DAS S, WUNDERLICH A, SAUCH JF. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. **Science.** v.235 p.1040-1043, 1987.

GILLIN FD, REINER DS, BOUCHER SE. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. **Infect Immun.** v.56 p.705-707, 1988.

GILLIN FD, BOUCHER SE, ROSSI SS, REINER DS. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. **Exp Parasitol.** v.69 p.164-74, 1989.

GILLIN FD, HAGBLOM P, HARWOOD J, ALEY SB, REINER DS, MCCAFFERY M, SO M, GUINEY DG. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.87 p.4463-4467, 1990.

GOLDBERG AL, STEIN R, ADAMS J. New insights into proteasome function: from archaeobacteria to drug development. **Chem Biol.** v.2 p.503-508, 1995.

GONZALEZ J, FREVERT U, COREY EJ, NUSSENZWEIG V, EICHINGER D. Proteasome function is required for encystation of *Entamoeba invadens*. **Arch Med Res.** v.28 p.139-40, 1997.

GONZALEZ J, BAI G, FREVERT U, COREY EJ, EICHINGER D. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. **Eur J Biochem.** v.264 p.897-904, 1999.

GUPTA RS, AITKEN K, FALAH M, SINGH B. Cloning of *Giardia lamblia* heat shock protein HSP70 homologs: implications regarding origin of eukaryotic cells and of endoplasmic reticulum. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.91 p.2895-2899, 1994.

HEHL AB, MARTI M, KÖHLER P. Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. **Mol Biol Cell**. v.11 p.1789-800, 2000.

HEHL AB, REGOS A, SCHRANER E, SCHNEIDER A. Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. **PLoS ONE**. v.2 p.e488, 2007.

HERNANDEZ Y, ZAMORA G, RAY S, CHAPOY J, CHAVEZ E, VALVARDE R, WILLIAMS E, ALEY SB, DAS S. Transcriptional analysis of three major putative phosphatidylinositol kinase genes in a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. **J Eukaryot Microbiol**. v.54 p.29-32, 2007.

HOLBERTON DV. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. **J Cell Sci**. v.13 p.11-41, 1973.

HOLBERTON DV. Mechanism of attachment of *Giardia* to the wall of the small intestine.
Trans R Soc Trop Med Hyg. v.67 p.29-30, 1973b.

HOLBERTON DV. Attachment of *Giardia* – a hydrodynamic model based on flagellar activity. **J Exp Biol**. v.60 p.207-221, 1974.

HUBBARD SR E TILL JH. Protein tyrosine kinase structure and function. **Annu Rev Biochem** v.69 p.373–398, 2000.

HUG H, SARRE TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? **Biochem J**. v.291 p.329-343, 1993.

KABNICK KS, PEATTIE DA. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. **J Cell Sci**. v.95 p.353-360, 1990.

KAPELLER, R., AND CANTLEY, L. C. Phosphatidylinositol 3-kinase. **Bioessays**. v.16 p.565-576, 1994.

KATTENBACH WM, PIMENTA PF, DE SOUZA W, PINTO DA SILVA P. *Giardia duodenalis*: a freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. **Parasitol Res.** v.77 p.651-658, 1991.

KEELING PJ. Genomics. Deep questions in the tree of life. **Science.** v.317 p.1875-1876, 2007.

KEISTER DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.77 p.487-488, 1983.

KIM KT, MOK MT, EDWARDS MR. Protein kinase B from *Giardia intestinalis*. **Biochem Biophys Res Commun.** v.334 p.333-341, 2005.

KNIGHT, J. *Giardia*: not so special, after all? **Nature.** v.429 p.236-237, 2004.

KRASILNIKOV MA. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. **Biochemistry (Mosc).** v.65 p.59-67, 2000

KUMAGAI M, MAKIOKA A, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. *Entamoeba invadens*: reversible effects of aphidicolin on the growth and encystation **Exp Parasitol.** v.90 p.294-297, 1998.

KUHN D, WIESE M. LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. **Mol Microbiol.** v.56 p.1169-1182, 2005.

LADEIRA RB, FREITAS MA, SILVA EF, GONTIJO NF, GOMES MA. Glycogen as a carbohydrate energy reserve in trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol Res.** v.96 p.418-421, 2005.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v.227 p.680-685, 1970.

LANFREDI-RANGEL A, ATTIAS M, DE CARVALHO TM, KATTENBACH WM, DE SOUZA W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J Struct Biol.** v.123 p.225-235, 1998.

LANFREDI-RANGEL A, KATTENBACH WM, DINIZ JA JR, DE SOUZA W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microbiol Lett.** v.181 p.245-251, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A. Aspectos celulares do processo de encistamento de *Giardia lamblia*. Tese de Doutorado – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

LANFREDI-RANGEL A, ATTIAS M, REINER DS, GILLIN FD, DE SOUZA W. Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. **J Struct Biol.** v.143 p.153-163, 2003.

LANGFORD TD, SILBERMAN JD, WEILAND ME, SVARD SG, MCCAFFERY JM, SOGIN ML, GILLIN FD. *Giardia lamblia*: identification and characterization of Rab and GDI proteins in a genome survey of the ER to Golgi endomembrane system. **Exp Parasitol.** v.101 p.13-24, 2002.

LARSSON C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. **Cell Signal.** v.18 p.276-284, 2006.

LAUWAET T, DAVIDS BJ, TORRES-ESCOBAR A, BIRKELAND SR, CIPRIANO MJ, PREHEIM SP, PALM D, SVÄRD SG, MCARTHUR AG, GILLIN FD. Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. **Mol Biochem Parasitol.** v.152 p.80-89, 2007.

LEE DH, GOLDBERG AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends Cell Biol.** v.8 p.397-403, 1998.

LUJAN HD, MAROTTA A, MOWATT MR, SCIAKY N, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, NASH TE. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. **J Biol Chem.** v.270 p.4612-4618, 1995a.

LUJAN HD, MOWATT MR, CONRAD JT, BOWERS B, NASH TE. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. **J Biol Chem.** v.270 p.29307-29313, 1995b.

LUJAN HD, MOWATT MR, BYRD LG, NASH TE. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.93 p.7628-7633, 1996.

LUJAN HD, MOWATT MR, NASH TE. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.61 p.294-304, 1997.

MA X, SAYESKI PP. Identification of tubulin as a substrate of jak2 tyrosine kinase and its role in jak2-dependent signaling. **Biochemistry.** v.46 p.7153-7162, 2007.

MAIA C, ATTIAS M, URBINA J, GILBERT I, MAGARACI F, DE SOUZA W. Azasterols impair *Giardia lamblia* proliferation and induces encystation. **Biochem Biophys Res Commun.** v.363 p.310-316, 2007.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Effect of the antitubulin drug oryzalin on the encystation of *Entamoeba invadens*. **Parasitol Res.** v.86 p.625-629, 2000a.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Effect of cytochalasin D on the growth, encystation, and multinucleation of *Entamoeba invadens*. **Parasitol Res.** v.86 p.599-602, 2000b.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. *Entamoeba invadens*: protein kinase C inhibitors block the growth and encystation. **Exp Parasitol.** v.95 p.288-290, 2000c.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of *Entamoeba invadens*. **Arch Med Res.** v.31 p.S185-186, 2000d.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Effect of jasplakinolide on the growth, encystation, and actin cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. **J Parasitol.** v.87 p.399-405, 2001a.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, OHTOMO H, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by wortmannin. **Parasitol Res.** v.87 p.371-375, 2001b.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. **J Parasitol.** v.88 p.994-999, 2002.

MAKIOKA A, KUMAGAI M, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. **Parasitol Res.** v.93 p.68-71, 2004.

MARTI M, LI Y, SCHRANER EM, WILD P, KOHLER P, HEHL AB. The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. **Mol Biol Cell**. v.14 p.1433-1447, 2003.

MARTINEZ-GAC L, ALVAREZ B, GARCIA Z, MARQUES M, ARRIZABALAGA M, CARRERA AC. Phosphoinositide 3-kinase and Forkhead, a switch for cell division. **Biochem Soc Trans**. v.32 p.360-361, 2004.

MCCAFFERY JM, GILLIN FD. *Giardia lamblia*: ultrastructural basis of protein transport during growth and encystation. **Exp Parasitol**. v.79 p.220-235, 1994.

MELLOR H, PARKER PJ. The extended protein kinase C superfamily. **Biochem J** v.332 p.281-292, 1998.

MENG TC, ALEY SB, SVARD SG, SMITH MW, HUANG B, KIM J, GILLIN FD. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. **Mol Biochem Parasitol** v.79 p.103-108, 1996.

MOWATT MR, LUJAN HD, COTTEN DB, BOWERS B, YEE J, NASH TE, STIBBS HH. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. **Mol Microbiol**. v.15 p.955-963, 1995.

NUCKOLLS GH, OSHEROV N, LOOMIS WF, SPUDICH JA. The Dictyostelium dual-specificity kinase splA is essential for spore differentiation. **Development**. v.122 p.3295-3305, 1996.

ONISHI K, HIGUCHI M, ASAKURA T, MASUYAMA N, GOTOH Y. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts. **Genes Cells**. v.12 p.535-46, 2007.

OWEN RL. The ultrastructural basis of Giardia function. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v.74 p.429-433, 1980

PAUGAM A, BULTEAU AL, DUPOUY-CAMET J, CREUZET C, FRIGUET B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. **Trends Parasitol**. v.19 p.55-59, 2003.

PEATIE DA, ALONSO RA, HEIN A, CAULFIELD JP. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. **J Cell Biol.** v.109 p.2323-2335, 1989.

PIVA B E BENCHIMOL M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. **Biol Cell.** v.96 p.735-746, 2004.

REINER DS, MCCAFFERY M, GILLIN FD. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. **Eur J Cell Biol.** v.53 p.142-153, 1990.

REINER DS, HETSKO ML, DAS S, WARD HD, MCCAFFERY M, GILLIN FD. *Giardia lamblia*: absence of cyst antigens and reduced secretory vesicle formation and bile salt uptake in an encystation-deficient subline. **Exp Parasitol.** v.77 p.461-72, 1993.

REYNOLDS ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol.** v.17 p.208-212, 1963

ROGER AJ, SVARD SG, TOVAR J, CLARK CG, SMITH MW, GILLIN FD, SOGIN ML. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.95 p.229-234, 1998.

SCHÖBER M, RAGHAVAN S, NIKOLOVA M, POLAK L, PASOLLI HA, BEGGS HE, REICHARDT LF, FUCHS E. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. **J Cell Biol.** v.176 p.667-680, 2007.

SCHOLZE H, FREY S, CEJKA Z, BAKKER-GRUNWALD T. Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. **J Biol Chem.** v.271 p.6212-6216, 1996.

SCHUPP DG, JANUSCHKA MM, SHERLOCK LA, STIBBS HH, MEYER EA, BEMRICK WJ, ERLANDSEN SL. Production of viable *Giardia* cysts in vitro: determination by fluorogenic dye staining, excystation, and animal infectivity in the mouse and Mongolian gerbil. **Gastroenterology.** v.95 p.1-10, 1988.

SEBOLT-LEOPOLD JS, ENGLISH JM. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. **Nature.** v.441 p.457-62, 2006.

SOLTYS BJ, FALAH M, GUPTA RS. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. **J Cell Sci.** v.109 p.1909-1917, 1996.

STEFANIC S, PALM D, SVÄRD SG, HEHL AB. Organelle proteomics reveals cargo maturation mechanisms associated with Golgi-like encystation vesicles in the early-diverged protozoan *Giardia lamblia*. **J Biol Chem.** v.281 p.7595-7604, 2006.

SVARD SG, HAGBLOM P, PALM JE. *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. **FEMS Microbiol Lett.** v.218 p.3-7, 2003.

SUN CH, MCCAFFERY JM, REINER DS, GILLIN FD. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. **J Biol Chem.** v.278 p.21701-21708, 2003.

TAMAOKI T, NOMOTO H, TAKAHASHI I, KATO Y, MORIMOTO M, TOMITA F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. **Biochem Biophys Res Commun.** v.135 p.397-402, 1986.

TOVAR J, LEON-AVILA G, SANCHEZ LB, SUTAK R, TACHEZY J, VAN DER GIEZEN M, HERNANDEZ M, MULLER M, LUCOCQ JM. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. **Nature.** v.426 p.172-176, 2003.

VANHAESEBROECK B, LEEVERS SJ, AHMADI K, TIMMS J, KATSO R, DRISCOLL PC, WOSCHOLSKI R, PARKER PJ, WATERFIELD MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annu Rev Biochem.** v.70 p.535-602, 2001.

VANHAESEBROECK, B E WATERFIELD, MD. Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases. **Experimental Cell Research.** v.253 p.239-254, 1999.

WALKER EH, PACOLD ME, PERISIC O, STEPHENS L, HAWKINS PT, WYMAN MP, WILLIAMS RL. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. **Mol Cell.** v.6 p.909-919, 2000.

WARD HD, ALROY J, LEV BI, KEUSCH GT, PEREIRA ME. Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. **Infect Immun.** v.49 p.629-634, 1985.

WELCH HCE, COADWELL WJ, STEPHENS LR, HAWKINS PT. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. **FEBS lett.** v.547 p.93-97, 2003.

WESTHOFF MA, SERRELS B, FINCHAM VJ, FRAME MC, CARRAGHER NO. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. **Mol Cell Biol.** v.24 p.8113-8133, 2004.

WIESEHAHN GP, JARROLL EL, LINDMARK DG, MEYER EA, HALLICK LM. *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. **Exp Parasitol.** v.58 p.94-100, 1984.

YU LZ, BIRKY CW JR, ADAM RD. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. **Eukaryot Cell.** v.1 p.191-199, 2002.

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](#)