



Inibidores de histonas desacetilases alteram a proliferação, viabilidade e promovem mudanças ultraestruturais em trofozoítos de *Giardia intestinalis*

Mestranda: Roberta Verissimo França de Oliveira

Duque de Caxias
2020

Roberta Verissimo França de Oliveira

Inibidores de histonas desacetilases alteram a proliferação, viabilidade e promovem mudanças ultraestruturais em trofozoítos de *Giardia intestinalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – UNIGRANRIO como requisito básico para o título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadoras:

Prof^a Marlene Benchimol

Dr^a Ana Paula Rocha Gadelha

Duque de Caxias

2020

ROBERTA VERISSIMO FRANÇA DE OLIVEIRA

Inibidores de histonas desacetilases alteram a proliferação, viabilidade e promovem mudanças ultraestruturais em trofozoítos de *Giardia intestinalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – UNIGRANRIO como requisito básico para o título de Mestre em Ciências Biomédicas.

29 de dezembro de 2020.

(Prof.^a Dr.^a Marlene Benchimol, Professora, Orientadora)

(Dr.^a Ana Paula R. Gadelha – Pesquisadora em Metrologia e Qualidade - Biologia Estrutural – INMETRO, Orientadora)

(Dr.^a Aline Zuma – Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ)

(Dr.^a Emilie Barrias - Pesquisadora em Metrologia e Qualidade - Biologia Estrutural – INMETRO)

(Dr.^o Fabio Fortes - Coordenador Adjunto do Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Biomedicina Translacional - BIOTRANS (UNIGRANRIO-UEZO-INMETRO)

Dedico este trabalho à minha mãe Carla Maria Verissimo de Oliveira por sempre apoiar meus sonhos e me dar forças para seguir em frente. Dedico de forma póstuma a minha avó Júlia Ventura dos Santos por sempre me ensinar a lutar e nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho:

Ao Prof. Wanderley de Souza por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório e dividido seu conhecimento comigo, principalmente durante a pandemia do COVID- 2019. É um privilégio ter a honra de conviver com um cientista tão célebre quanto como o senhor. Nunca seria capaz de expressar o quanto sou grata por ter essa oportunidade.

Aos professores e a equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer por me receber em suas dependências, me acolher e ajudar.

Às professoras Miria Pereira a Marcia Attias por me auxiliarem durante uso de equipamentos na microscopia ou na cultura.

Aos técnicos Veronica, Noêmia, Israel e Luiz Otavio por todo auxílio e aprendizado, sem a ajuda de vocês nada disso poderia ser realizado.

Aos mestrandos Marcus Vinicius e Felipe pelos momentos de conversas e distrações; a doutoranda Carlla por todo empenho em dividir comigo seu conhecimento sobre diversas técnicas, auxílio para mexer em equipamentos e conversas motivacionais quando tudo parecia perdido.

Meu eterno agradecimento à Dr^a Carol, Juliana Portes, Juliana Vidal, Camila e Tatiana Araújo.

Aos Técnicos e professores do CENABIO, em especial Adélia e Sara que me ajudaram a utilizar os microscópios de varredura e transmissão.

À equipe do Laboratório de Metrologia e Qualidade Biologia Estrutural do INMETRO, Thayne, Jean, Yuri, Michele, Paula e Flávio, obrigada pelo suporte técnico nos microscópios eletrônicos de varredura ou transmissão, pela amizade e palavras de apoio.

Aos doutores Aline Zuma, Emilie Brrias e Fabio Fortes por terem aceito o convite para a banca julgadora desta dissertação de mestrado.

Ao **Profº. Celso Santana** pelas sugestões e revisão feita.

Agradecimentos à família e aos amigos:

A **Deus** pelo dom da vida e por tudo de bom que tem me ajudado a alcançar.

Aos meus pais por me apoiarem e me incentivarem a cada conquista. Por estarem ao meu lado, de forma incondicional para que eu pudesse sonhar e voar. Em especial a minha querida mãe por ser meu exemplo, meu esteio, a razão por eu ter conseguido chegar até aqui.

Ao grupo dos anaeróbios, Tati, Júlio, Raphael, Dalila e Paula, por me derem apoio, me fazerem rir, terem se tornado parte da minha família, obrigada a cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Profª. Marlene Benchimol, por me dar essa incrível oportunidade. Nunca vou conseguir palavras suficientes para agradecer a senhora por toda dedicação e pelo carinho ao longo desses quase três anos. Agradeço a cada puxão de orelha, que com certeza me ajudarão futuramente. Obrigada por não desistir de mim, apesar de tudo que fiz. Hoje eu só queria que a senhora soubesse o quanto mudou minha vida e o quanto é importante para mim. Sou muito grata por apreender como devemos ensinar, cuidar e zelar por todos os que somos responsáveis. Então mais uma vez, obrigada por me mostrar uma nova forma de ver o mundo e dividir conosco sua experiência de vida. Meus mais sinceros agradecimentos, sem a senhora essa dissertação nunca teria sido finalizada. Desculpe por todo estresse que fiz a senhora passar!

A Drª Ana Paula Gadelha obrigada por acreditar em mim e aceitar dividir com a Prof. Marlene a orientação desta dissertação. Sou muito grata por toda a sua ajuda, dedicação e cuidado comigo, e mesmo nos momentos difíceis para

você, se manteve ao meu lado. Meu eterno Obrigada. Sei que todas as cobranças foram para tentar extrair o meu melhor. Obrigado Ana, por me ajudar e me apoiar. Tenho toda a gratidão do mundo por você.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

1 **Resumo**

2 Giardíase é uma doença intestinal que anualmente afeta
3 aproximadamente 280 milhões de pessoas. Causada pelo protozoário parasita
4 *Giardia intestinalis*, que apresenta duas fases durante seu ciclo de vida: o cisto
5 e o trofozoíto. Por mais de cinco décadas, o tratamento da giardíase foi baseado
6 em nitrocompostos, mas a resistência e o fracasso do tratamento em alguns
7 pacientes têm aumentado e, a necessidade de desenvolver novas abordagens
8 quimioterápicas contra a giardíase é amplamente reconhecida. Mecanismos
9 epigenéticos como acetilação e desacetilação de proteínas histonas já são alvos
10 de vários estudos em *Giardia* e estão associados à variação antigênica e
11 diferenciação celular. Acetilação das histonas é controlada pela atividade das
12 histonas acetilases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs). As HDACs de
13 classe I foram encontradas em vários protozoários parasitas, incluindo *G.*
14 *intestinalis*. Tendo em vista seu papel biológico, os inibidores de histonas
15 desacetilases podem se tornar alternativas interessantes para o tratamento de
16 doenças parasitárias. Neste estudo, análises da proliferação, viabilidade, ciclo
17 celular; assim como análises morfológicas foram utilizadas para compreender os
18 efeitos de quatro inibidores de HDACs de classe I, denominados KV-24, KV-30,
19 KV-46 e KV-50. Dentre todos os compostos testados, o KV-46 foi o mais eficiente
20 e diminui a proliferação e a viabilidade do parasita. As observações por
21 microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram a presença de protruções
22 na superfície e internalização de flagelos após o tratamento. A análise por
23 microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou a presença de vacúolos
24 com figuras mielínicas e vacuolização no citoplasma após incubação com o
25 composto KV-46. Os ensaios de ciclo celular indicaram o aumento da
26 porcentagem de células na fase G2/M após exposição a droga. Os ensaios por
27 microscopia óptica mostraram que parasitas em divisão apresentam a citocinese
28 interrompida. Os dados aqui apresentados, indicam que os inibidores de HDACs
29 de classe I têm efeitos significativos na proliferação e organização estrutural dos
30 trofozoítos de *G. intestinalis*, sugerindo que a via de desacetilação de histonas
31 deve ser explorada.

32 **Abstract**

33 Giardiasis an intestinal disease that affects approximately 280 million people.
34 Caused by the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*, has two phases during its
35 life cycle: the cyst and the trophozoite. For more than five decades, treatment of
36 giardiasis has been based on nitrocomposites, but resistance and failure of
37 treatment some patients have increased, need to develop new forms of
38 chemotherapy treatment against giardiasis is recognized largely. Epigenetic
39 mechanisms as acetylation and deacetylation of histone proteins are already
40 targets various studies in *Giardia* and are associated with antigenic variation and
41 cell differentiation. Histone acetylation is controlled by the activity of histone
42 acetylases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Class I HDACs have
43 been found in several parasitic protozoa, including *G. intestinalis*. In view of their
44 biological role, inhibitors of histone deacetylases can become interesting
45 alternatives for the treatment of parasitic diseases. In this study, analyzes of
46 proliferation, viability, cell cycle; as well morphological analyzes were used to
47 understand the effects of four class I HDAC inhibitors, called KV-24, KV-30, KV-
48 46 and KV-50. Among all tested compounds, KV-46 was most efficient and
49 decreased parasite proliferation and viability. Scanning electron microscopy
50 (SEM) revealed the presence of protrusions on the cell surface and internalization
51 of flagella after treatment. Analysis by transmission electron microscopy (MET)
52 showed the presence of vacuoles with myelinated figures and vacuolization in the
53 cytoplasm after incubation with the compound KV-46. Cell cycle assays indicated
54 an increase in the percentage of cells in G2 / M phase after exposure to the drug.
55 The light microscopy assays demonstrated that parasites in division presented a
56 blocked cytokinesis. The data here indicate that class I HDAC inhibitors have
57 effects on proliferation and structural organization of *G. intestinalis* trophozoites,
58 suggesting that the histone deacetylation pathway should be explored.

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Giardia intestinalis</i>	16
1.2. Giardíase	18
1.3. Epidemiologia	19
1.3.1. Giardíase: Bioterrorismo	22
1.4. Ciclo Biológico	25
1.5. Morfologia do Parasita	27
1.5.1. Trofozoítos	27
1.5.2. Cistos	28
1.6. Citoesqueleto do Parasita	30
1.6.1. Microtúbulos	30
1.6.2. Flagelos	30
1.6.3. Disco Ventral	32
1.6.4. Funis	34
1.6.5. Corpos Medianos	35
1.7. Organelas e estruturas celulares de <i>G. intestinalis</i>	36
1.7.1. Núcleo	36
1.7.2. Nucléolos	37
1.7.3. Retículo endoplasmático	38
1.7.4. Complexo de Golgi	38
1.7.5. Vesículas periféricas	39
1.7.6. Vesículas específicas de encistamento (ESVs)	40
1.7.7. Mitossomos	41
1.8. Histonas	42
1.8.1. Acetilação e desacetilação das Histonas	44
1.8.2. Histonas em <i>G. intestinalis</i>	46
1.8.2.1 Mecanismos epigenéticos na diferenciação <i>G. intestinalis</i>	47
1.9. Tratamento atual da doença	49
1.10. Inibidores de histonas desacetilases e suas utilizações na terapêutica atual	50
2. JUSTIFICATIVA	54

3. OBJETIVOS	55
3.1. Objetivo Geral	55
3.2. Objetivos específicos	55
4. METODOLOGIA	56
4.1. Cultivo de <i>G. intestinalis</i>	56
4.2. Cultivo das células intestinais humanas	57
4.3. Compostos	57
4.4. Curva de crescimento	58
4.5. Ensaio de viabilidade dos trofozoítos	59
4.5.1. Ensaio de viabilidade por MTS/PSM	59
4.5.2. Ensaio de viabilidade com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio	60
4.6. Análise da toxicidade em células de mamíferos	60
4.7. Citometria de Fluxo	61
4.7.1. Ensaio para avaliação do ciclo celular	61
4.8. Imunofluorescência	62
4.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	62
4.10. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)	63
4.11. <i>Western Blotting</i>	64
5. RESULTADOS	66
5.1. Ensaio preliminar da viabilidade dos trofozoítos tratados com HDACi	66
5.2. Curvas de Crescimento	67
5.3. Viabilidade Celular	71
5.3.1. Viabilidade do Trofozoíto por MTS/PMS	71
5.3.2. Viabilidade celular por Diacetato de fluoresceína e iodeto de Propídio	72
5.4. Ensaio de citotoxicidade em células de mamífero	74
5.5. Ciclo Celular	75
5.6. Imunofluorescência	78
5.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	79
5.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	82
5.9. <i>Western Blotting</i>	84

6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÕES	98
8. REFERÊNCIAS	99

61

62

63 **Lista de abreviaturas**

64 **CDC** - Controle de Prevenção em Doenças

65 **CWP** - Proteínas da Parede do Cisto

66 **D** - Disco ventral;

67 **DDAs** -Doenças Diarreicas Agudas

68 **DMSO** – Dimetilsulfóxido

69 **ECVs** - Vesículas Positivas para Carboidratos

70 **ESVs** - Vesículas Específicas de Encistamento

71 **F** – Funis;

72 **FDA** - *Food & Drug Administration*

73 **FL** – Flagelos

74 **HATs** - Histonas Acetiltransferases

75 **HDACi** – Inibidores de Histonas Desacetilases

76 **HDACs** - Histonas desacetilases

77 **MB** - Corpos Medianos;

78 **MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão

79 **MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

80 **MTOCs** - Centro Organizador de Microtúbulos

81 **MTs** - Microtúbulos

82 **N** - Núcleos;

83 **OMS** – Organização Mundial de Saúde

84 **PTMs** - Modificações Pós-traducionais da Tubulina

85 **PV**- Vesículas Periféricas

86 **RE** - reticulo endoplasmático

87 **SFB** – Soro Fetal Bovino

88 **SUS** – Sistema Único de Saúde

89 **TSA** - Tricostatina A

90 **TST**- Tubastatina

91 **VPs** – Vesículas Periféricas

92 **VSP** – Proteínas Variantes de Superfície

93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis também denominada como *Giardia lamblia* ou *Giardia duodenalis* é o agente etiológico da doença conhecida como giardíase (GUTIÉRREZ, 2017). Na literatura, o parasita foi descrito pela primeira vez por Antony Van Leeuwenhoek quando, em 1681, examinou amostras de suas próprias fezes e observou pequenos seres que se movimentavam denominando-os “pequenos animálculos” (ZUIDERVAART e ANDERSON, 2016).

Trata-se de um protozoário flagelado da classe Zoomastigofora, pertencente à ordem Diplomonadida que faz parte da Família Hexamitidae (ADAM, 2001) e alterna as formas trofozoítica e cística no seu ciclo de vida onde, respectivamente, esses estágios são os responsáveis pela doença clínica e pela transmissão da mesma (GUTIÉRREZ, 2017).

Durante muitos anos, *G. intestinalis* foi apresentado como um organismo simples, mas, um modelo intrigante e de difícil estudo. Atualmente, através de estudos de genotipagem indicaram que as espécies de *Giardia* são classificadas em oito grupos genéticos (cepas) A – H distintos (EMERY-CORBIN et al., 2019). As cepas A e B são encontradas em humanos e em outros animais, geneticamente diferem quanto à sua infectividade, antigenicidade e virulência. As cepas C e D são encontradas em cachorros; F em gatos; E nos animais de casco; G em roedores e a cepa H nos mamíferos marinhos (GUTIÉRREZ, 2017).

Além disso, essas oito espécies de *Giardia* morfologicamente distintas também são nomeadas de acordo com o hospedeiro que infectam de forma predominante. A *Giardia intestinalis* (*Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis* e *Giardia lamblia*) geralmente infecta humanos e outros mamíferos. Existem também a (1) *Giardia muris* encontradas em roedores; (2) *Giardia agilis* em anfíbios, (3) *Giardia ardeae* em aves; (4) *Giardia psittaci*, também em aves; (5) *Giardia microti* em ratazanas, (6) *Giardia peramelis* em quenda (*Isoodon obesulus* do sul, marsupial), (7) *Giardia cricetarum* em hamster (LYU et al., 2018).

127 **Quadro 1: Diferentes espécies de *Giardia* e seus respectivos hospedeiros**

Espécies	Hospedeiros	Morfologia
<i>G. agilis</i>	Anfíbios	Mais longo e delgado que <i>G. intestinalis</i>, com corpo mediano em forma de lágrima
<i>G. ardeae</i>	Garças e outros pássaros	Semelhante à <i>G. intestinalis</i>
<i>G. cricetidarium</i>	Hamster	Os seus trofozoítos são geralmente maiores e mais robustos do que a maioria dos outros
<i>G. intestinalis</i>	Mamíferos, incluindo seres humanos, cães e algumas espécies selvagens	Forma de lágrima com corpos medianos em forma de garra
<i>G. microti</i>	Roedores, ratazanas e ratos almiscarados	Semelhante à <i>G. intestinalis</i>
<i>G. muris</i>	Roedores	Mais curto e mais redondo que <i>G. intestinalis</i>, com corpo mediano pequeno e arredondado
<i>G. psittaci</i>	Aves	Semelhante à <i>G. intestinalis</i>
<i>G. peramelis</i>	Quenda	Semelhante à <i>G. intestinalis</i>

128

129 **Fonte: GUTIÉRREZ, 2017.**

130

131 Um dos grandes debates no mundo científico é de que, apesar de não
 132 haver base taxonômica para justificar a utilização do nome "*lamblia*", seu uso
 133 ainda é frequentemente empregado e isso acaba por gerar confusão, obscurecer
 134 a epidemiologia e dificultar análises moleculares (THOMPSON, 2000). No que
 135 diz respeito aos nomes '*duodenalis*' e '*intestinalis*', eles são usados com igual
 136 frequência e as opiniões divergem em como interpretar as regras complexas da
 137 *Zoonomenclatura*.

138

139 1.2. Giardíase

140 No Brasil, Giardíase que é a enfermidade causada por *G. intestinalis* é
141 classificada como uma das doenças do grupo das Doenças Diarreicas Agudas
142 (DDAs) e possui altas taxas de morbidade e mortalidade infantil. Na maioria dos
143 casos, esta doença frequentemente é associada as precárias condições de vida
144 e vulnerabilidade de saúde em que alguns indivíduos vivem, como falta do
145 saneamento básico, indisponibilidade de água tratada, maus hábitos de higiene
146 e baixo poder socioeconômico (SANTANA et al., 2014). Porém, vale ressaltar
147 que giardíase pode acometer qualquer pessoa em qualquer idade e de qualquer
148 classe social.

149 Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças negligenciadas
150 que são provocadas por protozoários intestinais são comuns em humanos no
151 mundo todo, possuem alta taxa de morbimortalidade, provocam, ao ano, mais
152 de 58 milhões de casos de diarreia causados por protozoários, e os custos giram
153 em torno de US\$ 150 milhões (SAVIOLI et al., 2006). Doenças Negligenciadas
154 são um grupo de doenças parasitárias, bacterianas ou virais que possuem
155 distribuição e sobreposição heterogênea. Ocorrem principalmente nos países
156 em desenvolvimento onde o clima, a pobreza e falta de acesso a serviços
157 básicos influenciam diretamente os resultados. Além disso, essas doenças
158 quando avaliadas juntas, exibem uma carga global considerável e crescente,
159 prejudicando a capacidade de pessoas infectadas em alcançar seu pleno
160 potencial, seja no desenvolvimento socioeconômico ou em outras oportunidades
161 (SAVIOLI et al., 2006).

162 O indivíduo com giardíase pode desenvolver a doença de duas formas,
163 sendo a forma assintomática quando não há presença de sintomas e muitas
164 vezes o indivíduo não sabe que está infectado, ou a forma sintomática na qual,
165 geralmente, os sintomas mais comuns são: diarreia, flatulência, dores e
166 distensão abdominal, náuseas, vômitos, febre, desidratação, perda de peso,
167 entre outros (BURET, 2008). Além disso, em crianças, a giardíase pode se
168 agravar e causar retardo no crescimento físico, intelectual, desnutrição severa e
169 quando em casos mais graves até o óbito, principalmente na faixa etária de 0 a
170 5 anos. O diagnóstico da doença é feito através do exame de fezes ou pelo

171 método de ELISA e a manifestação clínica pode perdurar por semanas a anos
172 sendo dividida em duas fases: aguda e crônica. A giardíase aguda normalmente
173 dura 1 a 3 semanas, provoca má absorção de gordura e açúcar, perda de peso
174 ponderal significativo em casos graves, porém não são encontrados sangue ou
175 leucócitos nas fezes. Já quando evolui para a fase crônica pode causar fezes
176 muito fétidas, distensão abdominal, eructação fétida e, ocasionalmente,
177 prejudicar o desenvolvimento, principalmente em crianças (CDC, 2018).

178 **1.3. Epidemiologia**

179 Por se tratar de uma doença que tem facilidade de ser transmitida através
180 da água e de alimentos, a giardíase é considerada um grave problema de saúde
181 no mundo inteiro e uma doença tida como negligenciada. Está distribuída
182 mundialmente, sobretudo, em regiões tropicais e subtropicais, e seu pico de
183 aparecimento ocorre anualmente durante o início do verão até o início do outono
184 (CDC, 2018).

185 O centro de controle de prevenção em doenças dos Estados Unidos
186 estima que 76 milhões de pessoas anualmente são acometidas por essa
187 enfermidade, mais de 300.000 são hospitalizadas e 5.000 em decorrência do
188 agravamento dela chegam ao óbito. Os muitos jovens, os idosos, os
189 imunocomprometidos e os viajantes são consideradas como grupos de risco,
190 pois sua suscetibilidade à doença é maior (GUTIÉRREZ, 2017).

191 A incidência mundial da giardíase foi estimada em 280 milhões ao ano
192 (LANE e LLOYD, 2002). Entretanto, estudos epidemiológicos já relataram que
193 essas taxas podem ser significativamente subestimadas em decorrência das
194 subnotificações e das manifestações clínicas assintomáticas (GUTIÉRREZ,
195 2017). As taxas de prevalência podem variar de 10 a 20% da população geral,
196 10 a 50% nos países em desenvolvimento e de 2 para 5% nos
197 desenvolvidos (GUTIÉRREZ, 2017). Além disso, infecções sintomáticas foram
198 relatadas por milhões na Ásia, África e América Latina pela Organização Mundial
199 da Saúde, que estimou 183 milhões de casos de giardíase.

200 Em países desenvolvidos como o Reino Unido e a Alemanha, a doença é
201 relatada principalmente como rara, pois geralmente só afeta os viajantes
202 (GUTIÉRREZ, 2017). Nos Estados Unidos, desde a criação da Lei da Água

203 Potável em 1974 e suas subsequentes alterações (1986, 1996), grandes surtos
204 associados com fontes de água são incomuns (DALY et al., 2009), porém, nos
205 anos de 2011 e 2012, respectivamente, foram relatados 16.868 e 15.223 casos
206 de giardíase no país. As taxas de incidência de todos os casos relatados tiveram
207 média de 6,4 por 100.000 habitantes em 2011 e de 5,8 por 100.000 habitantes
208 no ano de 2012. Durante esses anos, os casos relatados com mais frequência
209 foram de crianças de 1 a 4 anos, seguido por crianças entre 5 a 9 anos e adultos
210 de 45 a 49 anos (DALY et al., 2009).

211 Um estudo realizado por Adam e colaboradores (2016) durante os anos
212 de 1997 a 2011 mostrou que nos Estados Unidos ocorreram 242 surtos nos quais
213 41.000 pessoas foram infectadas e que a maioria dos surtos foi resultado da
214 transmissão adquirida pela água (74,8%), comida (15,7%), pessoa a pessoa
215 (2,5%) e contato com animais (1,2%) evidenciando que ainda naquela época, a
216 água contaminada era a maior forma de transmissão da giardíase no país
217 (ADAM et al., 2016).

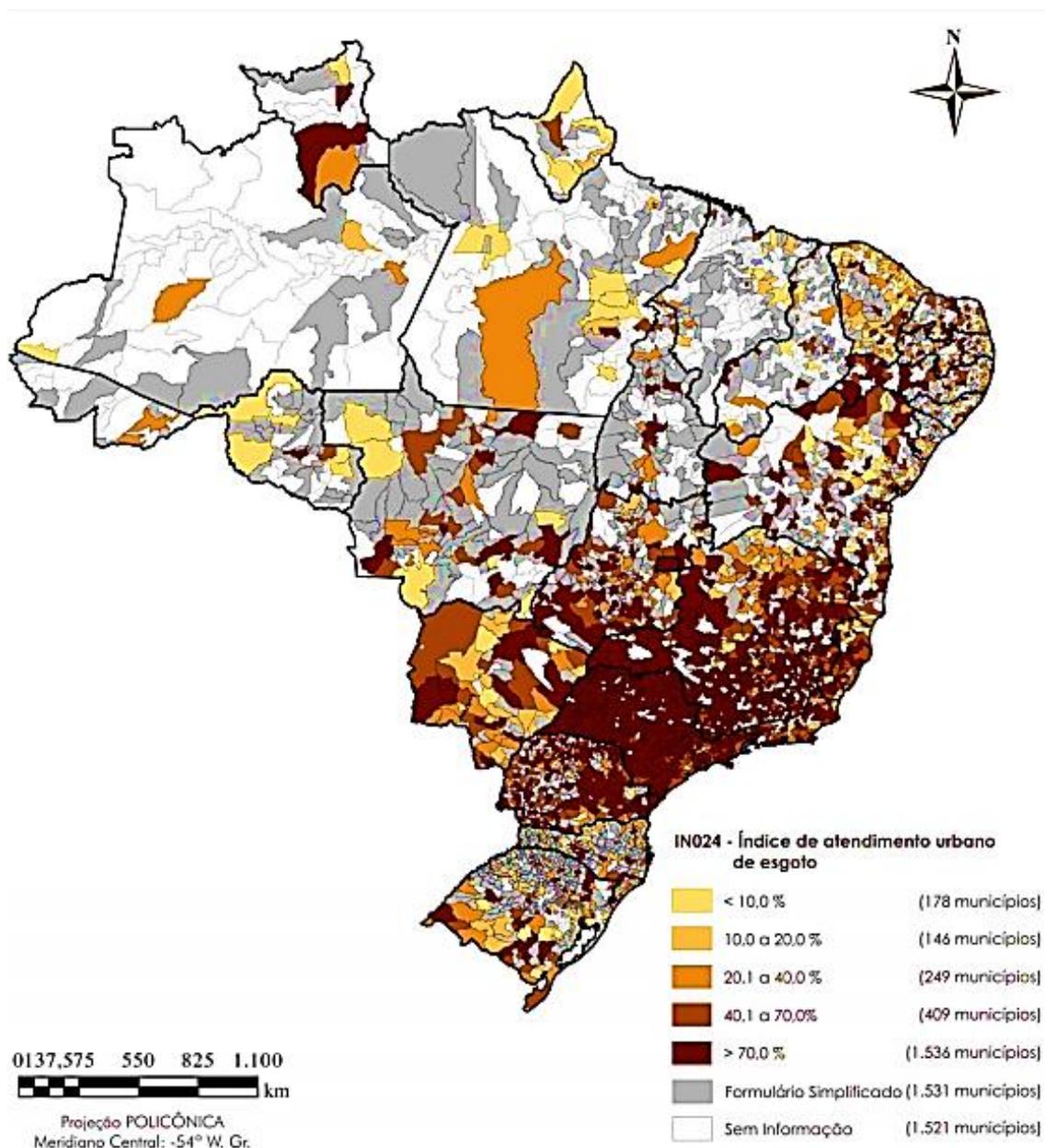
218 No Brasil, a prevalência da giardíase varia de 12,4% a 50%, dependendo
219 do estudo, da região e da faixa etária pesquisada. Predomina em crianças entre
220 zero e seis anos principalmente aquelas que frequentam creches/escolas e isso
221 não está associado somente ao nível social e econômico das famílias
222 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além disso, o hábito de defecar em lugares
223 impróprios, associados com precário sistema de saneamento e água tratada,
224 também pode ser considerado responsável pela ineficácia da interrupção da
225 cadeia transmissória da doença. Outro fator que pode contribuir para a infecção
226 são as enchentes que espalham os cistos e podem contaminar a distribuição de
227 água, auxiliando o ciclo de vida do parasita. Os vetores mecânicos como moscas
228 e baratas também auxiliam na disseminação dos cistos.

229 Como é possível observar na **figura 1**, os índices médios de atendimento
230 urbano com rede coletora de esgotos em todos os municípios brasileiros
231 apontam discrepância de valores quanto a distribuição do serviço. Observamos
232 que na **figura 1** as regiões Norte, Centro-Oeste e parte da região Nordeste
233 possuem os piores índices sobre o atendimento urbano de esgoto. Além disso,
234 há uma predominância de municípios que sequer possuem informações
235 disponíveis sobre a distribuição do sistema de esgoto.

236

237 **Figura 1: Representação espacial do índice de atendimento urbano por**
 238 **rede coletora de esgotos (IN024).**

239



240

241

242 **Fonte: Ministério do Desenvolvimento Regional, 2019**

243

244

245

246 **1.3.1. Giardíase: Bioterrorismo**

247 Mais um aspecto importante da giardíase é que o parasita *G. intestinalis*
248 pode ser considerado como agente de bioterrorismo. Segundo o CDC,
249 bioterrorismo é definido como uma disseminação ou uso intencional de
250 microrganismos ou toxinas utilizados para causar doenças, gerar pânico,
251 histerismo coletivo e/ou causar a morte em populações de animais, pessoas ou
252 plantas (CDC, 2018). Ao longo dos anos, o CDC organizou a classificação dos
253 agentes possíveis de bioterrorismo em três categorias: A, B e C mediante o tipo
254 de agente liberado e o grau de prejuízo a ser causado por ele (CDC, 2018).

255 Na categoria A ficam os agentes de alta prioridade que incluem
256 organismos que representam risco para a segurança nacional pois são
257 facilmente disseminados ou transmitidos, causam altas taxas de mortalidade,
258 geram grande impacto no sistema de saúde, podem levar ao pânico público e
259 perturbações sociais. Já os da categoria classificada como B, são aqueles que
260 acontecem da liberação intencional ou ameaça de liberação de agentes
261 biológicos (vírus, bactérias, fungos ou suas toxinas) que podem causar doenças,
262 têm taxas moderadas de morbidade, mas baixa taxa de mortalidade e têm o teor
263 de aterrorizar a população civil com o intuito de manipular ações do governo. Por
264 fim, o grupo classificado como C são aqueles que representam os agentes de
265 maior prioridade como patógenos emergentes que poderiam ser projetados para
266 disseminação em massa, com altas taxas de morbimortalidade e grande impacto
267 na saúde e economia (CDC, 2018). Nesse cenário, *G. intestinalis* é classificada
268 como agente de categoria B, pois se trata de um parasita que ameaça à
269 segurança hídrica uma vez que seus cistos são altamente resistentes e de fácil
270 transporte.

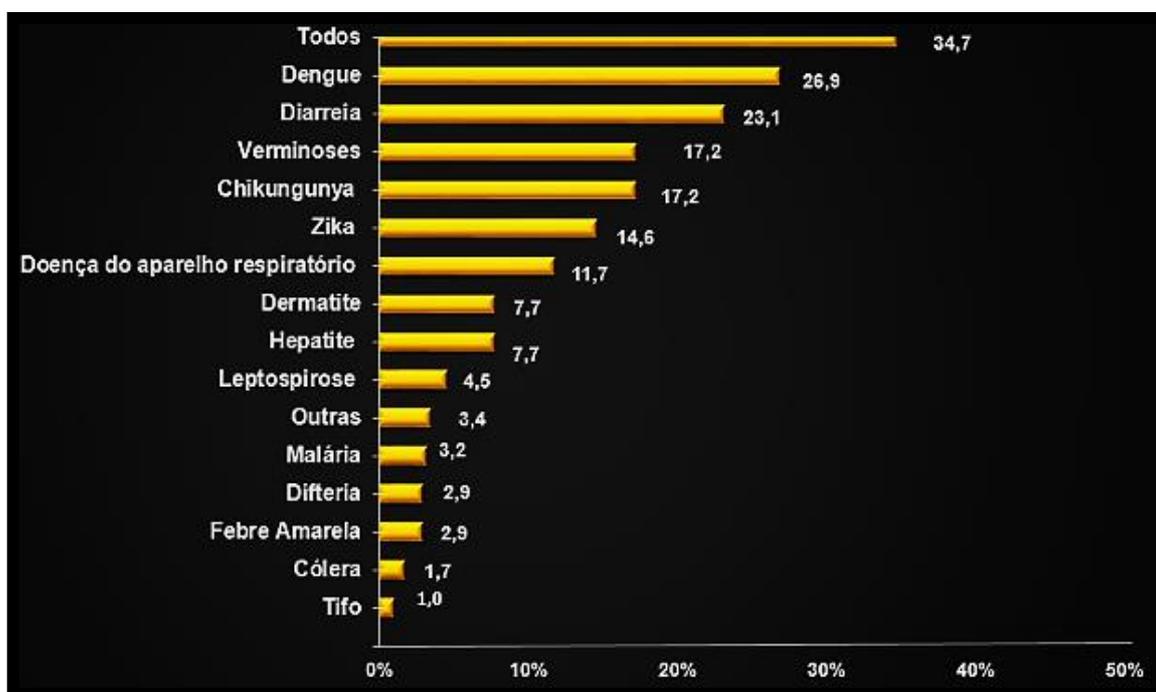
271 No Brasil, a giardíase está associada às principais doenças que têm sua
272 disseminação através do sistema hídrico e são responsáveis por causar as
273 Doenças Diarreicas Agudas (DDA). Em decorrência da gravidade da doença
274 principalmente em crianças, alteração no padrão clínico epidemiológico, alto
275 potencial de disseminação e surgimento de surtos ou epidemias, magnitude,
276 gravidade, severidade, transcendência e a vulnerabilidade que essas doenças
277 podem causar, a notificação de casos de DDA é compulsória e foram criadas

278 unidades sentinelas que realizam a Monitorização das Doenças Diarreicas
279 Agudas (MDDA) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

280 Outro ponto de atenção é que a contaminação pode acometer toda a
281 cadeia de produção alimentar, desde as atividades primárias até o consumo
282 (plantio, transporte, manuseio, cozimento, acondicionamento), e segundo dados
283 do IBGE (2017) como é possível observar na **figura 2**, a diarreia foi a segunda
284 causa de doenças mais citada e com maior frequência pelos municípios
285 perdendo apenas para a dengue. Além disso, em algumas regiões do Brasil, há
286 um alto índice de mortalidade como mostra a **figura 3**. Assim, é evidente que
287 DDA, em especial aquelas provocadas por *G. intestinalis*, são um grave
288 problema de saúde pública.

289

290 **Figura 2: Porcentagem das doenças com maior frequência nos municípios**
291 **brasileiros que afirmaram ter conhecimento sobre ocorrência de endemias**
292 **ou epidemias de cada doença – 2017.**

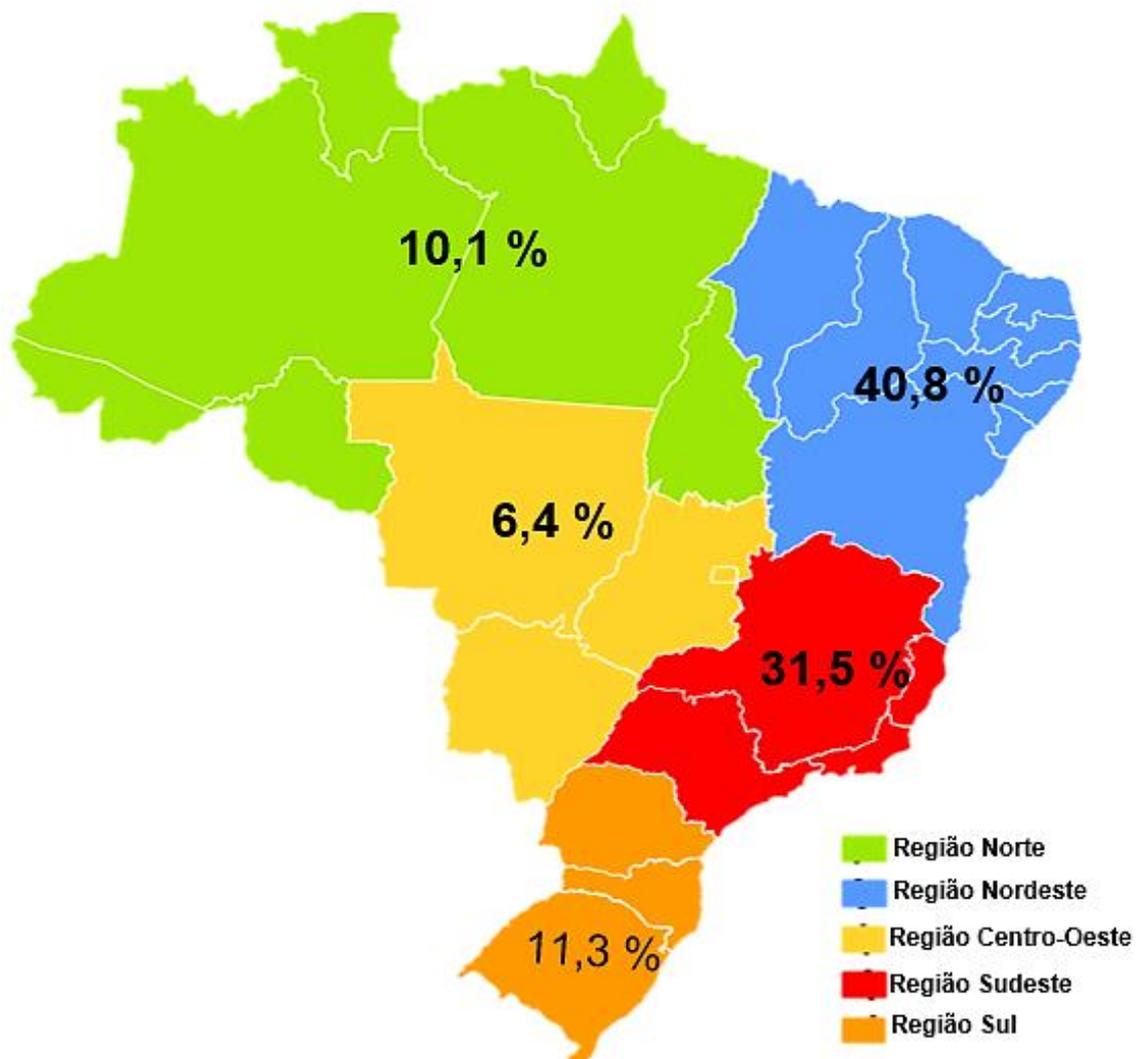


293

294 **Fonte: IBGE, 2017.**

295

296 **Figura 3: Porcentagem de mortalidade por DDA nas cinco diferentes**
297 **regiões brasileiras – 2017.**



298

299 **Fonte: Ministério da Saúde adaptado, 2017.**

300

301 **1.4. Ciclo Biológico**

302 O ciclo de vida do protozoário *G. intestinalis* (**Figura 4**) é composto por
303 dois estágios: o cisto e o trofozoíto. A infecção ocorre pela ingestão de cistos
304 através de água e alimentos contaminados ou pela via fecal-oral (mãos ou
305 fômites), onde estes são altamente infecciosos (**Figura 4.1**). Estudos revelam
306 que a ingestão de apenas 10 cistos leva a infecção (CDC, 2015; GUTIÉRREZ,
307 2017; EMERY-CORBIN et al., 2019). Sabe-se ainda que uma pessoa infectada
308 poderá lançar em suas fezes de 1 a 10 milhões de cistos diariamente, por isso,
309 a cadeia de transmissão da doença pode perdurar por vários meses (CDC,
310 2015).

311 Após o cisto ser ingerido pelo hospedeiro, a etapa de desencistamento
312 (**Figura 4.2**) se inicia no estômago quando a parede cística entra em contato
313 com pH ácido e enzimas gástricas. Esse processo finaliza-se no duodeno com a
314 ação das enzimas pancreáticas e do pH mais alcalino. Após o desencistamento,
315 os cistos se diferenciam em trofozoítos (**Figura 4.3**) e estes iniciam o processo
316 de fissão binária (**Figura 4.4**) dando origem a 4 trofozoítos para cada cisto
317 (ADAM, 2001; BURET, 2008).

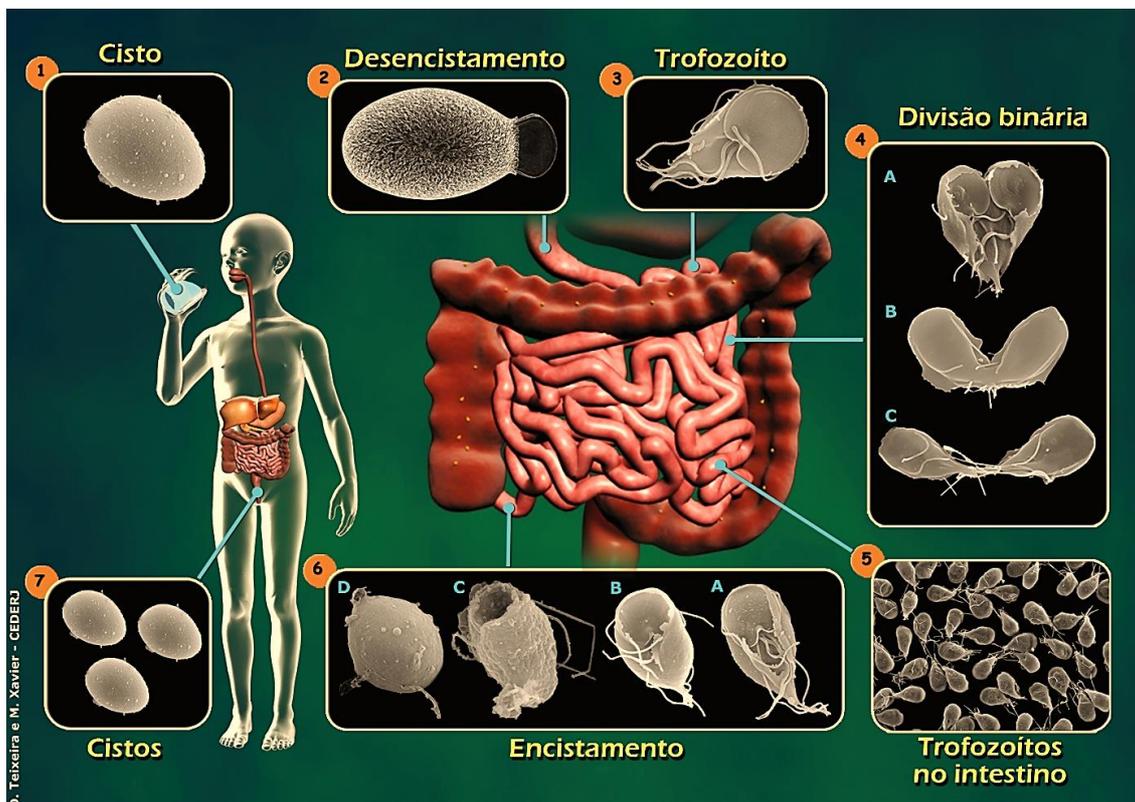
318 Acredita-se que os trofozoítos aderem ao epitélio do duodeno e do jejuno
319 através do disco ventral, formando uma monocamada (**Figura 4.5**), provocando
320 inflamação local e iniciando o quadro efetivamente da giardíase. Estudo
321 anteriores já demonstraram que essa interação parasita e célula hospedeira
322 pode provocar, além das manifestações clínicas com os sintomas clássico,
323 também a interrupção do complexo juncional do epitélio do intestino, a indução
324 de apoptose de células intestinais, a degradação dos fatores imunes do
325 hospedeiro (quimosinas e imunoglobulinas), a depleção do muco e a disbiose da
326 microbiota intestinal (ALLAIN et al., 2019; DI GENOVA e TONELLI, 2016).

327 Durante o processo de divisão, os trofozoítos destacam-se do epitélio
328 intestinal. Quando alguns desses parasitas caem na luz do intestino, são
329 carregados para porções inferiores através dos movimentos peristálticos. Ao
330 chegarem ao íleo, possivelmente pelo contato com os sais biliares do lúmen,
331 esses trofozoítos se diferenciam em cistos por um processo conhecido como
332 encistamento (**Figura 4.6**). Após formados, os cistos são eliminados nas fezes

333 (Figura 4.7), reiniciando assim a cadeia de transmissão do parasita (ALLAIN et
 334 al., 2019).

335

336 **Figura 4. Esquema do ciclo de vida da *G. intestinalis* em seus dois estágios,**
 337 **trofozoíto e cisto.**



338

339 **Esquema mostrando o ciclo de *G. intestinalis*:** 1. Ingestão de cistos através
 340 da água ou alimentos contaminados. 2. Existamento: saída dos trofozoítos do
 341 cisto. 3. Trofozoíto: forma de adesão às células epiteliais do intestino delgado. 4.
 342 Divisão binária dos trofozoítos. 5. Formação da monocamada pelos trofozoítos
 343 nas células intestinais. 6. Encistamento: saída dos trofozoítos do cisto. 7.
 344 Eliminação dos cistos nas fezes. **Fonte:** D. Teixeira, M. Xavier e M. Benchimol,
 345 2011, não publicado.

346 **1.5. Morfologia do Parasita**

347 **1.5.1. Trofozoítos**

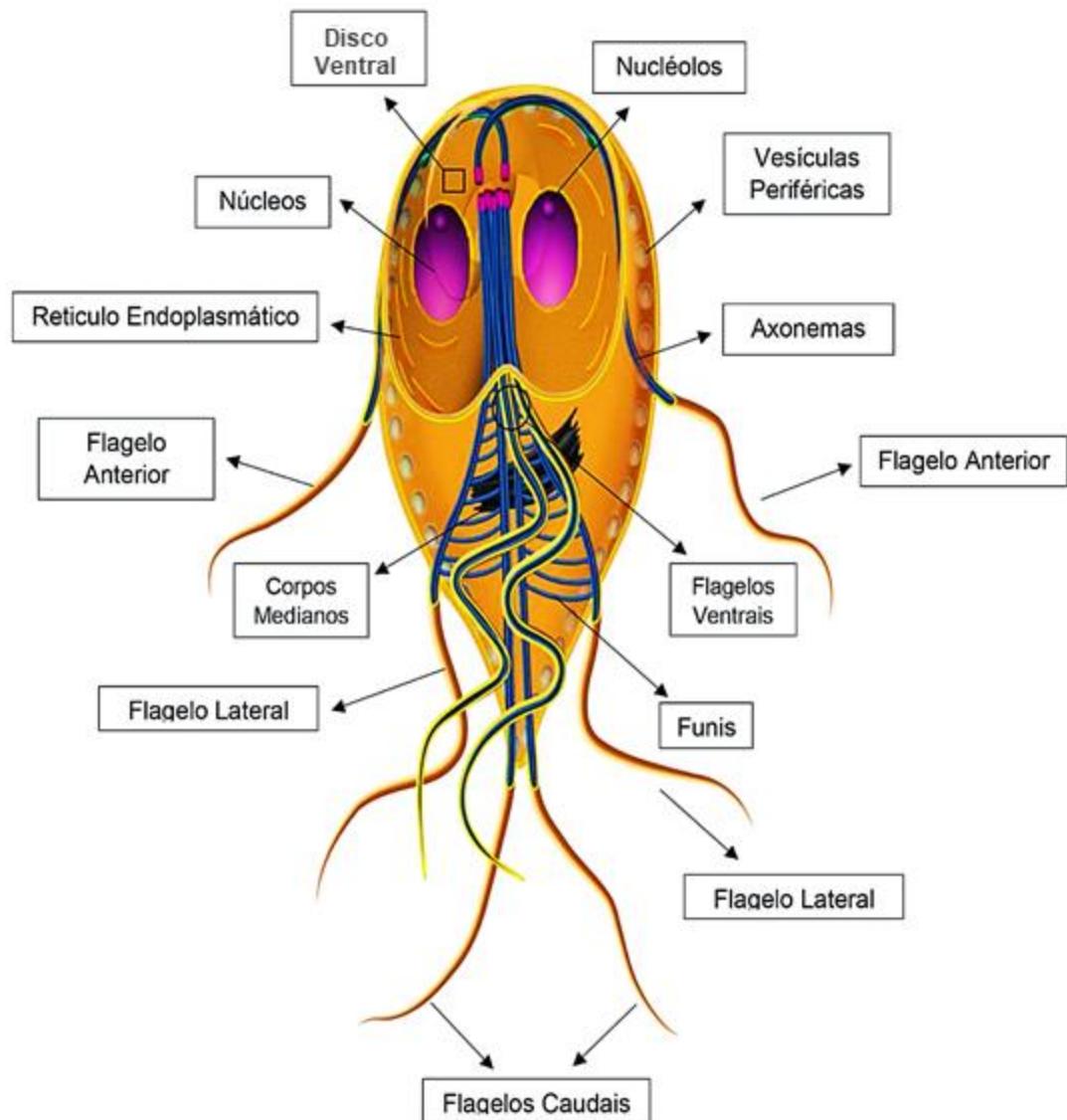
348 O trofozoíto (**Figura 5**) de *G. intestinalis* mede aproximadamente 12–15
349 µm de comprimento, apresenta uma porção anterior mais ampla e uma porção
350 caudal cônica que mede cerca de 5 a 9 µm de largura, o que faz com que o
351 parasita tenha um formato semelhante ao de uma pera cortada. Possui dois
352 núcleos, quatro pares de flagelos (anteriores, caudais, posterior-laterais e
353 ventrais), um disco ventral, corpo mediano, funis e flange. O citoesqueleto é
354 formado por microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos, e os
355 microtúbulos dos flagelos apresentam um arranjo típico de (9+2) (NOSALA et al.,
356 2018; KIM e PARK 2019; GADELHA et al., 2019).

357 Tem um conjunto de vesículas denominadas vesículas periféricas e uma
358 rede de retículo endoplasmático muito difusa, os dois núcleos possuem um
359 complexo de membranas nucleares muito semelhantes aos observados em
360 células eucarióticas superiores e, durante a diferenciação de trofozoítos em
361 cistos, aparecem mais dois tipos de vesículas ligadas à membrana: vesículas
362 específicas para encistamento (ESVs) e vesículas positivas para carboidratos
363 (ECVs) que atuam na construção da parede do cisto (MIDDLEJ et al., 2017).
364 Possui ainda ribossomos e grânulos de glicogênio dispersos no citoplasma, não
365 tem mitocôndrias típicas, mas tem uma estrutura chamada de mitossomos que
366 seriam as mitocôndrias vestigiais (TOVAR et al., 2003), pois exercem função
367 semelhante às das mitocôndrias no metabolismo do parasita. Quanto ao
368 Complexo de Golgi, ainda existe grande debate sobre sua presença ou não, pois
369 alguns autores acreditam que as ESVs teriam função semelhante ao Complexo
370 de Golgi enquanto outros autores defendem que este parasita não possua esta
371 organela (MIDDLEJ et al., 2017; KIM e PARK, 2019).

372

373 **Figura 5: Esquema da morfologia do trofozoíto de *G. intestinalis***
 374 **destacando os flagelos e estruturas associadas parte interior do parasita.**

375



376

377 **Fonte: M. Benchimol, 2020, adaptado.**

378

379 **1.5.2. Cistos**

380 Os cistos (**Figura 6**) podem ter de dois a quatro núcleos, apresentar
 381 formato ovoide, com tamanhos que variam de 6 a 10 μm e uma parede cística
 382 com 0,3 a 0,5 μm de espessura. Essa parede cística é birrefringente, composta
 383 por uma camada mais externa filamentosa e uma camada mais interna com duas
 384 membranas (entre a membrana plasmática do parasita e a parede), os flagelos

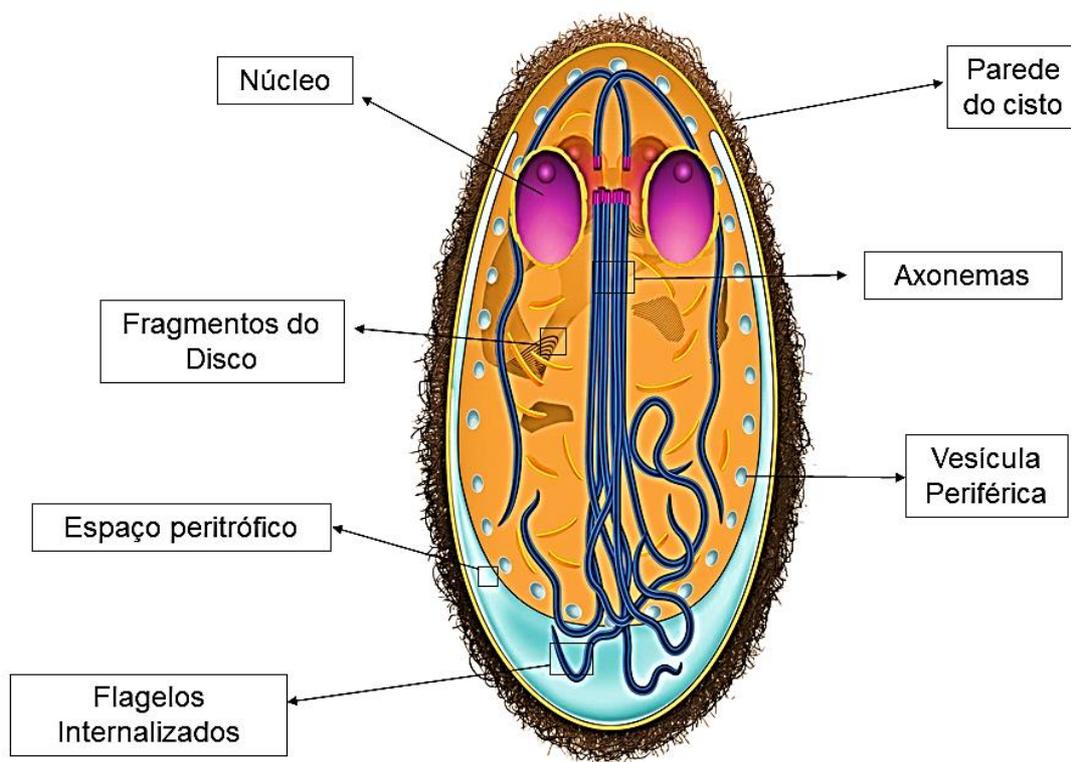
385 são internalizados e estão posicionados em um local chamado espaço
386 peritrófico.

387 Alguns estudos já demonstraram que as camadas filamentosas da parede
388 do cisto são compostas por 57% de proteínas e 43% por carboidrato, sendo que
389 as principais proteínas da parede do cisto (CWP) são as CWP1, CWP2 e CWP3,
390 e existe relativa permeabilidade seletiva de vários componentes a esta parede
391 como água, íons e pequenas moléculas. O cisto também possui corpúsculos
392 basais, axonemas (localizados próximo dos núcleos) e o disco ventral se
393 encontra fragmentado (MIDDLEJ et al., 2017; ALLAIN et al., 2019; KIM e PARK,
394 2019).

395

396 **Figura 6: Esquema da morfologia do trofozoíto de *G. intestinalis***
397 **destacando os flagelos e estruturas associadas parte interior do parasita.**

398



399

400

Fonte: M. Benchimol, 2020, adaptado.

401

402

403 **1.6. Citoesqueleto do Parasita**

404 **1.6.1. Microtúbulos**

405 Os microtúbulos (MTs) em eucariontes desempenham papel essencial na
406 formação de estruturas celulares através do equilíbrio entre a polimerização e
407 despolimerização dos polímeros que os formam. Esses polímeros
408 citoesqueléticos são compostos por heterodímeros de α - e β -tubulina, possuem
409 estabilidade dinâmica (polimerização ou despolimerização), sua organização é
410 feita nas matrizes de MTs, são fortemente controlados por proteínas associadas
411 a MT (MAPs) e têm por função promover ou suprimir os MTs (HAGEN et al., 2020).

412 Novos filamentos de MT são formados por nucleação, dependem de
413 complexos de anel γ -tubulina (γ -TuRCs), podem ser regulados pelo corte das
414 proteínas katanina e spastina, e podem sofrer inúmeras modificações pós-
415 traducionais da tubulina (PTMs), o que influencia diretamente na dinâmica dos
416 polímeros na formação dos MTs (NOSALA et al., 2018, KIM e PARK, 2019;
417 HAGEN et al., 2020).

418 No genoma de *Giardia*, sabe-se que há proteínas citoesqueléticas
419 estruturais conservadas, proteínas que regulam a nucleação de MT (γ -TuRCs),
420 proteínas que fornecem estabilidade e dinâmica das estruturas celulares
421 (katanina e EB1), proteínas que atuam na modificação da tubulina pós-
422 traducional (tubulina tirosinas ligases), possui ainda cinesina e dineína que são
423 responsáveis por regular a dinâmica da MT ou o tráfico de organelas, homólogos
424 de anexina (alfa-giardinas), NIMA (NEK) e proteínas exclusivas, apenas
425 encontradas em *Giardia* como giardinas α -, β -, γ - e δ . Entretanto, mesmo tendo
426 um citoesqueleto formado por microtúbulos muito elaborado, não possui
427 microtúbulos associados às quinases MAST e TTBK (Tau tubulina quinase)
428 (NOSALA et al., 2018; KIM e PARK, 2019; HAGEN et al., 2020)

429

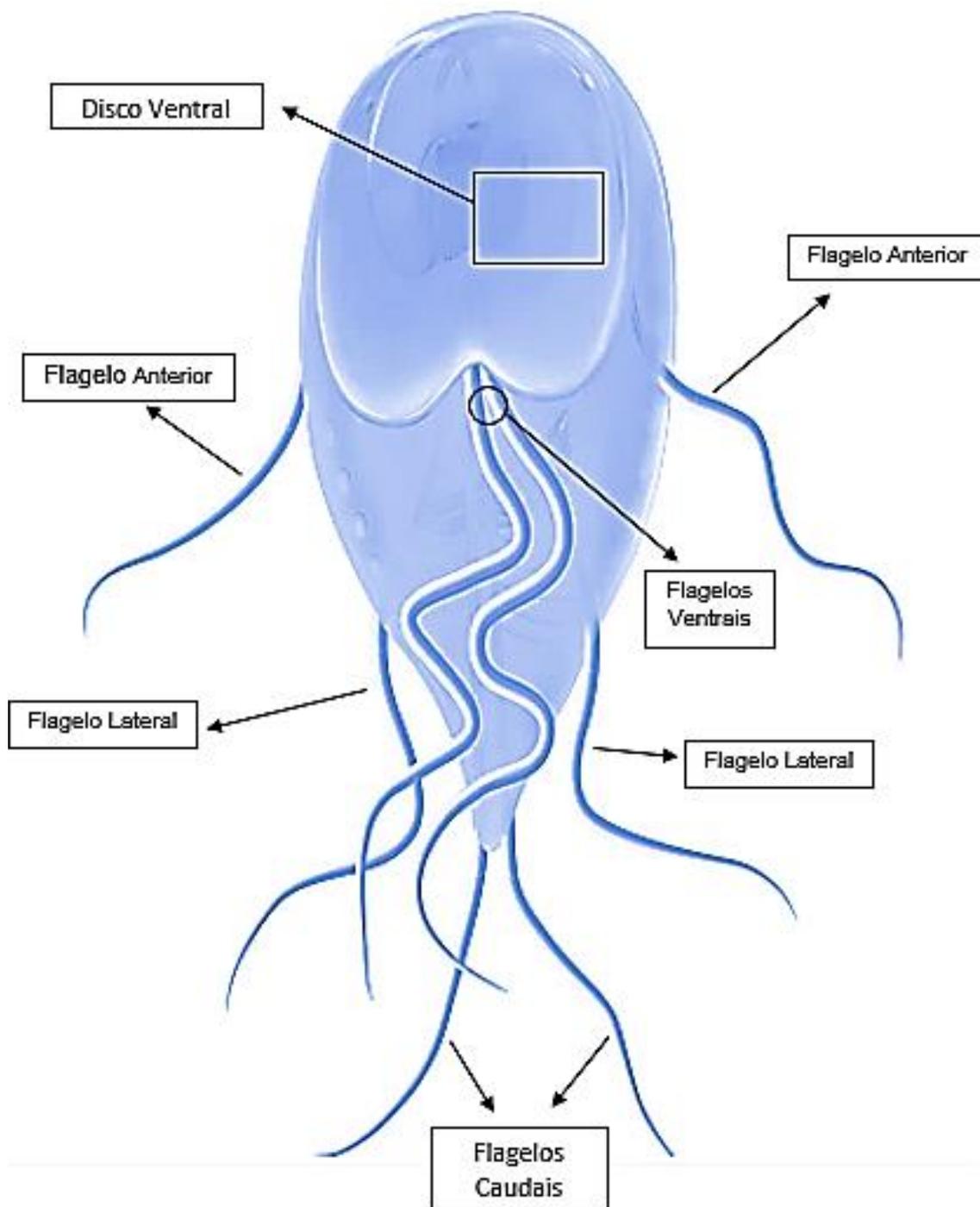
430 **1.6.2. Flagelos**

431 *G. intestinalis* têm oito flagelos (**Figura 7**) que são divididos em quatro
432 pares: anteriores, caudais, posterior-laterais e ventrais. Surgem dos corpúsculos
433 basais, que se localizam próximos à linha média e ântero-ventral em relação aos
434 núcleos, são responsáveis pela motilidade do parasita, auxiliam a divisão celular
435 e a adesão às células epiteliais do hospedeiro, e desempenham papel importante

436 durante os processos de encistamento e desencistamento (NOSALA e
437 DAWSON, 2015).

438

439 **Figura 7. Esquema da morfologia do trofozoíto de *G. intestinalis***
440 **destacando os flagelos do parasita.**



441

442 **Fonte: M. Benchimol, 2020, adaptado.**

443

444 A utilização dessas estruturas pelo parasita em sua motilidade é um
445 processo crucial para iniciar e manter a infecção no intestino, pois permite que
446 *G. intestinalis* evite o fluxo peristáltico e, conseqüentemente, procure os locais
447 adequados para sua fixação nas células epiteliais (KIM e PARK, 2019).

448 A estrutura flagelar é conservada, de formação canônica, que contém
449 raios radiais, braços de dineína, nove pares externos (dupletes) e um par central
450 de microtúbulos. Os pares flagelares diferem em relação à posição celular,
451 extensão do comprimento citosólico, são ligados à membrana e apresentam
452 associação com estruturas flagelares auxiliares (por exemplo, placas marginais).
453 Os axonemas se originam dos corpúsculos basais no interior da célula, retêm
454 uma região citosólica significativa antes de sair em uma bolsa ciliar para um
455 flagelo ligado à membrana, mas nem todos os pares flagelares possuem o
456 mesmo padrão e, durante a mitose, acredita-se que a associação de
457 microtúbulos dos corpúsculos basais com os polos do fuso determine a
458 polaridade de cada célula filha (KIM e PARK, 2019; GADELHA et al., 2019)

459 Nos flagelos são encontrados vários tipos de proteínas, entre elas estão
460 as α -giardinas, que possuem homologia com anexinas humanas e parecem ter
461 uma função na motilidade, adesão e estabilidade da membrana dos trofozoítos.
462 Além disso, estudos anteriores mostraram que as α -giardinas estão localizadas
463 nos flagelos caudais e ventrais, e que exibem um sítio de ligação a fosfolipídios
464 dependente de cálcio. A γ -tubulina e a centrina são localizadas nos corpúsculos
465 basais dos flagelos e indicam que essa região pode ser um centro organizador
466 de microtúbulos (MTOCs) (GADELHA et al., 2019).

467

468 **1.6.3. Disco Ventral**

469 O disco ventral (**Figura 8**), anteriormente denominado disco adesivo, é
470 formado por uma camada espiral de microtúbulos (MT) no sentido horário e
471 microfitas associadas à camada MT basal ao longo de todo o comprimento dos
472 MTs (GADELHA et al., 2019; KIM e PARK, 2019). O disco é dividido em oito
473 regiões: (1) região da zona de nucleação de microtúbulos; (2) região central
474 (conhecida como “área nua” pois não há MTs); (3) as regiões onde ocorrem as
475 zonas de sobreposições dorsais e (4) ventrais; (5) região onde nenhum
476 microtúbulo se sobrepõe, sendo considerado o corpo do disco; (6) região do

477 sulco ventral; (7) região à margem (microtúbulos nucleados na zona de
478 nucleação) e (8) região da crista lateral (GADELHA et al., 2019).

479 Rodeado por uma estrutura flexível chamada flange, o disco ventral tem
480 proteínas contrácteis como a actina, α -actinina, miosina e tropomiosina e um
481 grupo específico de proteínas encontradas somente no disco ventral: as
482 giardinas (KIM e PARK, 2019). Essas proteínas são classificadas em quatro
483 subgrupos, α -, β -, γ - e δ -giardinas (KIM e PARK, 2019).

484 Devido às divergências quanto à sua funcionalidade, o nome disco
485 adesivo foi substituído por disco ventral. Tal fato se deve a discussões quanto
486 ao mecanismo adesivo da *Giardia* às células intestinais. É pela região ventral
487 que *Giardia* se adere ao epitélio intestinal. No entanto, outros mecanismos de
488 adesão foram propostos, e uma das hipóteses para explicar o envolvimento
489 desta estrutura na adesão do parasita às células intestinais é que os movimentos
490 dos flagelos ventrais durante a adesão celular sustentariam a pressão de sucção
491 (força hidrostática) do disco devido ao batimento desses flagelos (HOLBERTON,
492 1973; CAMPANATI et al., 2002). Outra teoria é de que os flagelos ventrais
493 desempenhariam um papel secundário no processo e que a adesão não estaria
494 associada apenas aos movimentos flagelares, mas principalmente às estruturas
495 do disco ventral (HOLBERTON, 1974). E uma terceira teoria seria que a
496 membrana plasmática na área da periferia do disco ventral tocara a superfície
497 das células intestinais, formando contato contínuo na área da crista lateral,
498 ocorrendo uma blindagem lateral e pressionando a região da área nua dentro do
499 disco. Nessa teoria o batimento flagelar contribuiria apenas para o
500 posicionamento da célula (ERLANDSEN et al., 2004; LENAGHAN et al., 2011).

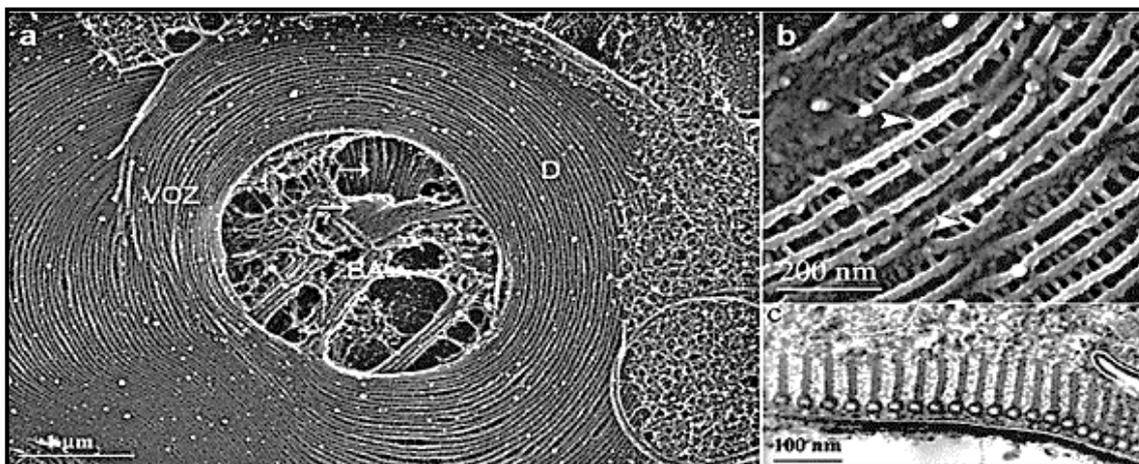
501 Outro fator muito debatido é que além dos processos mecânicos com as
502 estruturas do disco e flagelos, o parasita também usaria mecanismos
503 bioquímicos para realizar a adesão. Esta teoria é sustentada pelo fato de que *in*
504 *vitro* os parasitas tratados com algumas drogas diminuem a adesão e
505 possivelmente isso também aconteceria *in vivo* (WOESSNER e DAWSON, 2012;
506 MARIANTE et al., 2005).

507 Além da discutida função de aderir às células do hospedeiro, o disco
508 ventral desempenha um papel vital durante o processo de divisão, participando
509 da cariocinese (BENCHIMOL, 2004). No processo de encistamento, ocorre a

510 fragmentação do disco, que se reorganiza durante o desencistamento (KIM e
511 PARK, 2019).

512

513 **Figura 8: Citoesqueleto de *G. intestinalis* por microscopia eletrônica de**
514 **varredura de alta resolução.**



515

516 **(a)** Espiral do disco ventral; **D** – disco ventral; **BA** - área nua; **VOZ** - zona de
517 sobreposição ventral; **(b-c)** pontes cruzadas (**pontas de seta**), **microfitas e**
518 **microtúbulos** do disco. Imagem de GADELHA et al., 2019.

519

520 1.6.4. Funis

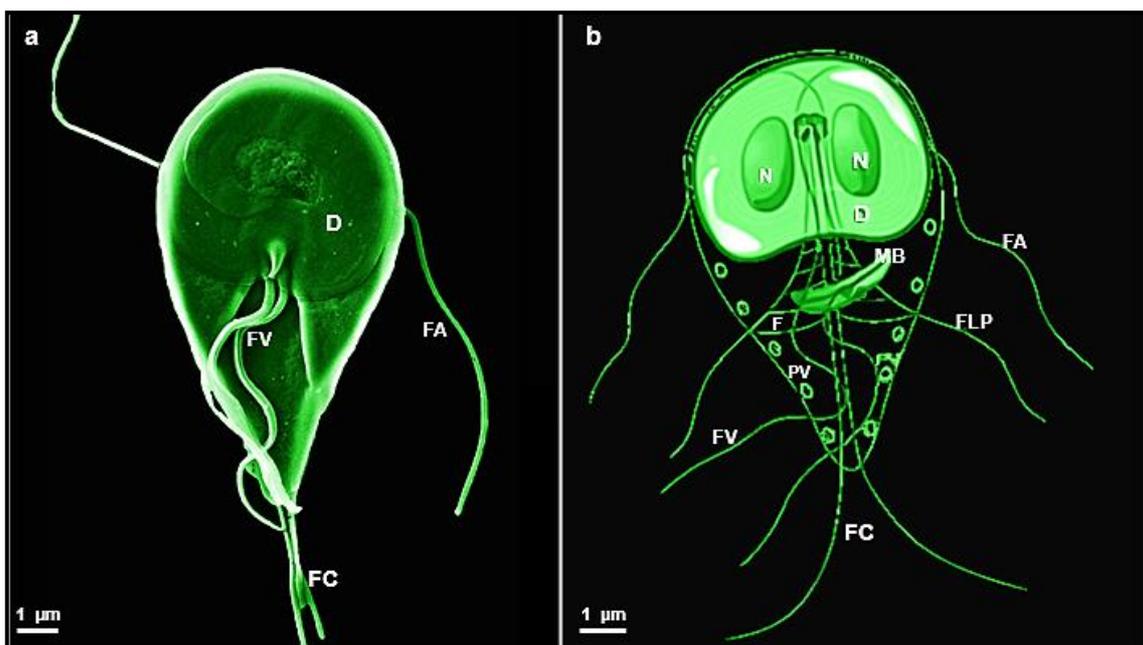
521 Pouco se conhece sobre esta estrutura, mas sabe-se que os funis (**Figura**
522 **9**) são estruturas microtubulares formadas por vários arranjos de microtúbulos,
523 que emanam dos axonemas dos flagelos centrais. Na região próxima aos
524 núcleos, os funis se apresentam em bandas bem definidas de microtúbulos
525 interconectados e na região do flagelo ventral os microtúbulos individuais se
526 destacam de cada banda e vão se espalhando lateralmente na posição dorsal
527 dos axonemas posteriores-laterais até a porção final do parasita. Os
528 microtúbulos dos funis são interconectados por pontes e revestidos por um
529 material indefinido. Estes não são dispersos no citoplasma, ficam conectados
530 aos flagelos posteriores-laterais e à membrana plasmática (CAMPANATI et al.,
531 2003; BENCHIMOL et al., 2004). Apesar de ainda ser discutido, acredita-se que
532 os funis participem da movimentação da região caudal da *Giardia* (BENCHIMOL
533 et al., 2004).

534

535 1.6.5. Corpos Medianos

536 O corpo mediano (MB) (**Figura 9**) é formado por um conjunto irregular de
 537 microtúbulos. Não se conhece muito sobre essa estrutura, mas acredita-se que
 538 atuem como uma reserva de tubulina pré-polimerizada para a montagem do
 539 disco ou como um centro organizador de microtúbulos (MTOC). Situados
 540 transversalmente aos axonemas, podem ser encontrados também em posição
 541 quase vertical. Podem medir entre 0,2 e 1,8 μm de espessura e de 0,8 a 8,0 μm
 542 de comprimento (PIVA e BENCHIMOL, 2004). Ao contrário de trabalhos antigos,
 543 esses últimos autores demonstraram que os corpos medianos não desaparecem
 544 durante a mitose do parasita, como se acreditava (PIVA e BENCHIMOL, 2004).

545
 546 **Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura (a) e esquema indicando**
 547 **estruturas subcelulares (b) do trofozoíto de *G. intestinalis*.**



548
 549 **N** - Núcleos; **D** - Disco ventral; **MB** - Corpos Medianos; **F** – Funis; **PV**- Vesículas
 550 Periféricas; **FA, FPL, FV, FC** – Flagelos: Flagelo Posterior-Lateral (**FLP**), Flagelo
 551 Anterior (**FA**); Flagelo Ventral (**FV**); (**FC**) - Flagelo Caudal. Barras = 1 μm . **Fonte:**
 552 BENCHIMOL et al., 2004, colorizado artificialmente com auxílio do programa de
 553 edição de imagens Photoshop.
 554
 555

556 **1.7. Organelas e estruturas celulares de *G. intestinalis***

557 **1.7.1. Núcleo**

558 O parasita é binucleado com simetria espelhada. Os núcleos têm formato
559 esférico ou oval e são simetricamente localizados na porção anterior da célula.
560 Possuem a mesma quantidade de cromossomos e homologia das sequências
561 de nucleotídeos, entretanto, os núcleos não são idênticos, podem diferir durante
562 as fases de condensação cromossômica e ter atividade metabólica diferente.
563 Além disso, possui enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais e a
564 epigenética do parasita desempenha papel relevante na patogenicidade, nos
565 mecanismos associados à diferenciação, na variação antigênica e na resistência
566 antiparasitária aos fármacos (BENCHIMOL, 2005; CARRANZA et al., 2016;
567 LAGUNAS-RANGEL e BERMÚDEZ-CRUZ, 2019).

568 Os dados sobre mitose de *Giardia* ainda são escassos e o mecanismo
569 exato da citocinese ainda é debate na literatura. Algumas teorias são aceitas
570 para melhor explicar a citocinese e a distribuição dos núcleos para as células
571 filhas, mas nenhuma delas chega a um consenso de como e quando os dois
572 núcleos do trofozoíto se dividem (BENCHIMOL, 2004; NOHYNKOVA, 2000;
573 BENCHIMOL, 2005).

574 Sabe-se que durante a mitose, os núcleos se dividem e os eixos mitóticos
575 são montados separadamente (NOHYNKOVA, 2000). A mitose acontece de
576 maneira semiaberta, onde o envelope nuclear é perfurado e os microtúbulos do
577 fuso entram no núcleo através de minúsculos orifícios. O fuso é observado na
578 telófase e, curiosamente, o parasita não sincroniza a divisão dos núcleos, sendo
579 possível encontrar células com três e até quatro núcleos, indicando assincronia
580 na divisão nuclear (BENCHIMOL, 2004; SONDA et al., 2010; KIM e PARK,
581 2019).

582 Os núcleos de *Giardia* possuem, como as demais células eucarióticas,
583 duas membranas interna e externa que compõem o envelope nuclear. A
584 membrana externa possui os complexos de poros e é contínua com a membrana
585 do retículo endoplasmático (RE), apresentando ribossomos envolvidos na
586 síntese de proteínas e “bolhas” que podem corresponder à formação de
587 vesículas. A membrana nuclear interna é trilaminar, apresenta proteínas
588 filamentosas que formam a lâmina nuclear e fornecem suporte estrutural para

589 essa membrana (BENCHIMOL, 2005; NOHYNKOVA, 2000; JIRÁKOVÁ et al.,
590 2012).

591 O parasita tem um genoma muito compacto, com significativa
592 simplificação da maioria dos processos celulares. Com os estudos genômicos e
593 proteômicos, descobriu-se que *G. intestinalis* possui apenas um homólogo
594 HDAC clássico (GL50803-3281), com localização nuclear, atividade desacetilase
595 nas proteínas histonas canônicas (duas cópias para os genes H2a, H2b e H3 e
596 três cópias do gene H4, com exceção da ligante histona H1), algumas variantes
597 como H3B e cenH3 (marcador de centrômeros), e que além disso, essas
598 proteínas sofrem modificações pós-traducionais através de enzimas como as
599 acetiltransferases (HATs), metiltransferases (HMTs), desacetilases (HDACs),
600 entre outros fatores de modificações de histonas (ZAMPONI et al., 2007;
601 SONDA et al., 2010; CARRANZA et al., 2016).

602 Em geral, as modificações pós-traducionais nessas proteínas permitem
603 que as células respondam de forma rápida e específica, pois, essas
604 modificações estão diretamente relacionadas à regulação da expressão gênica
605 e, portanto, têm papéis importantes nos principais processos epigenéticos,
606 virulência e o ciclo de vida do parasita (YEE et al., 2007; CARRANZA et al.,
607 2016).

608

609 **1.7.2. Nucléolos**

610 *G. intestinalis* exibe os menores nucléolos descritos na natureza até
611 agora, são difíceis de isolar em alta qualidade e quantidade, e por isso durante
612 muitos anos acreditou-se que este parasita não possuía esta estrutura. Mas
613 atualmente, com os avanços tecnológicos nas pesquisas, foi possível estudar o
614 nucléolo e entender os mecanismos da síntese de RNA ribossomal em *Giardia*
615 (JIMENEZ-GARCIA et al., 2008; TIAN et al., 2010; FENG et al., 2020).

616 Sabe-se que sua função está ligada à síntese de ribossomos, à formação
617 do RNA ribossomal e que isso pode variar através de cada etapa do ciclo celular
618 em que o parasita vai estar. O nucléolo se origina no nucleoplasma como uma
619 estrutura redonda ou oval e é transferido para a margem do envoltório nuclear,
620 onde componentes ribossomais são liberados no citoplasma (JIMENEZ-GARCIA
621 et al., 2008; TIAN et al., 2010).

622 Os nucléolos de *Giardia* medem cerca de 0,2-0,5 µm de diâmetro, mas
623 podem apresentar aumento de tamanho durante o crescimento celular e na
624 síntese de proteínas. Além disso, com as técnicas de reconstruções proteômicas
625 e da bioinformática foi possível identificar proteínas nucleolares específicas de
626 *Giardia* e várias proteínas nucleolares mais comuns em humanos (TIAN et al.,
627 2010; FENG et al., 2020).

628

629 **1.7.3. Retículo endoplasmático**

630 Alguns autores contestam a presença do retículo endoplasmático (RE) em
631 *Giardia*. Entretanto, outros pesquisadores demonstraram sua presença com o
632 uso da microscopia eletrônica e por testes citoquímicos, como a presença de
633 glicose-6-fosfato, uma enzima marcadora de RE. No entanto, alguns
634 pesquisadores acreditam que na verdade essa organela seria uma rede de
635 túbulos-vesiculares que desempenham funções de RE como as atividades
636 endocíticas, a formação de vesículas, síntese de proteínas e degradação
637 extracelular do material (WAMPFLER et al., 2014; MIDDLEJ et al., 2017;
638 ZAMPONI et al., 2017)

639 Em *Giardia*, considera-se que o RE seja uma organela de complexa
640 organização, com simetria bilateral e presença nos envoltórios nucleares e
641 também por todo o corpo celular. Além disso, embora possua um tráfico
642 secretório convencional, alguns elementos não se encontram presentes, os
643 mecanismos de modificações pós-traducionais e os de controle das proteínas
644 secretadas por glicosilação do tipo N, carecem de vários transportadores de
645 açúcares/nucleotídeos e a sua glicosilação é limitada, embasando desse modo
646 que essa organela seja uma rede túbulo-vesicular (WAMPFLER et al., 2014;
647 ZAMPONI et al., 2017).

648

649 **1.7.4. Complexo de Golgi**

650 Outra organela sob intensa controvérsia quanto a sua presença em *G.*
651 *intestinalis*, é o Complexo de Golgi. Em células eucarióticas já estudadas, o Golgi
652 se apresenta como várias cisternas empilhadas localizadas ao redor do núcleo
653 e próximas ao retículo endoplasmático. No entanto, em *Giardia*, essa morfologia

654 não foi identificada pelos métodos tradicionais (MIDDLEJ et al., 2017; ZAMPONI
655 et al., 2017; MOYANO et al., 2019).

656 Para alguns pesquisadores, a similaridade que existe entre as vesículas
657 de encistamento (ESVs) e o Golgi como a associação de COPI e COPII nas
658 ESVs, a sensibilidade das ESVs à Brefeldina A (medicamento que inibe o
659 movimento anterógrado das cisternas de Golgi) e a dependência das ESVs às
660 GTPases Sar1 e Arf1 para sua biogênese e maturação, respectivamente,
661 sustentam que estas as ESVs seriam organelas funcionalmente representantes
662 do complexo de Golgi em *Giardia* (WAMPFLER et al., 2014; ZAMPONI et al.,
663 2017; MOYANO et al., 2019). Porém, na contramão dessas observações, temos
664 o problema que as ESVs só são encontradas durante o processo de
665 encistamento. Além disso, não foram encontrados os marcadores clássicos de
666 Golgi como o GM130, galactose transferases ou Rab6. Desse modo, incluindo-se
667 a diferença morfológica entre o Golgi e as ESVs faz com que não se possa
668 afirmar que as ESVs sejam organelas semelhantes ao complexo de Golgi
669 encontrado em seres eucariontes superiores (WAMPFLER et al., 2014;
670 ZAMPONI et al., 2017; MOYANO et al., 2019).

671

672 **1.7.5. Vesículas periféricas (VPs)**

673 As vesículas periféricas (VPs) são organelas encontradas em *Giardia* e
674 recebem esse nome por serem formadas por vários pequenos vacúolos na
675 periferia da célula, imediatamente abaixo da membrana plasmática, em toda a
676 sua superfície. Possuem formato oval, são alongadas e geralmente medem de
677 100–300 nm. Vários estudos buscaram entender a função dessas vesículas
678 periféricas. Utilizando-se marcadores fluorescentes verificou-se que as vesículas
679 periféricas desempenhavam papel semelhante aos endossomos iniciais e tardios
680 e de lisossomos (LANFREDI-RANGEL et al., 1998; WAMPFLER et al., 2014),

681 As VPs possuem natureza ácida devido à presença de hidrolases ácidas,
682 têm a capacidade de incorporar e digerir partículas e moléculas externas.
683 Através da reconstrução tridimensional foi possível identificar a existência de
684 conexão entre algumas dessas vesículas formando grandes cisternas achatadas
685 (LANFREDI-RANGEL et al., 1998).

686 Estudos mais recentes demonstraram que as VPs também estão
687 envolvidas no tráfego de vesículas em *Giardia* (FASO e HEHL, 2010;
688 WAMPFLER et al., 2014), na formação de corpos multivesiculares e estão
689 presentes durante os processos de encistamento e excistamento (MIDDLEJ et al.,
690 2017).

691

692 **1.7.6. Vesículas específicas de encistamento (ESVs)**

693 As ESVs são vesículas com cerca de 1 µm de tamanho que surgem no
694 início do processo de encistamento. Seu nome é devido ao seu envolvimento
695 na produção de moléculas que vão formar uma matriz extracelular rígida ou seja,
696 a parede do cisto (CW) em *Giardia* (LAUWAET et al., 2007).

697 Pouco se sabe sobre os componentes que formam a CW, mas atualmente
698 se tem conhecimento de três proteínas específicas que foram denominadas
699 como CWP1, CWP2 e CWP3 (GILLIN et al., 1989). Além dessa parte proteica,
700 há outro componente que participa da formação da parede cística em *Giardia*,
701 que são os carboidratos. No entanto, esses não se encontram na mesma via de
702 formação e secreção das ESVs. Entre esses carboidratos da CW foram
703 caracterizados os homopolímeros glicano β (1–3) -GalNAc que compõem cerca
704 de 60% da parede do cisto (LUJAN et al., 1995; GILLIN et al., 1989; GERWIG et
705 al., 2002). Após muitos estudos, conseguiu-se identificar uma segunda vesícula
706 responsável por carrear os carboidratos da CW e, diferentemente das ESVs, tem
707 compartimentos distintos e foi denominada como ECVs (*encystation*
708 *carbohydrate-positive vesicles*) (MIDDLEJ et al., 2013). Estas vesículas medem
709 0,2–2 µm, estão presentes apenas em células em processo de encistamento e
710 participam da biogênese CW de *Giardia*. A origem dos ECVs parece estar
711 relacionada ao retículo endoplasmático, pois uma vesícula em desenvolvimento
712 foi detectada a partir dessa organela de maneira semelhante ao que acontece
713 com os ESVs. Ambas as vesículas secretadas são sintetizadas no RE e
714 secretadas por exocitose (MIDDLEJ et al., 2013; WAMPFLER et al., 2014).

715 As diferenças encontradas entre as ESVs e as ECVs foram: (1) as ECVs
716 são eletrólucidas, enquanto as ESVs são eletrondensas; (2) as ECVs não
717 reagem com os anticorpos contra as proteínas da parede cística de *Giardia*; (3)
718 o conteúdo das ECVs dá reação positiva para carboidratos, como quando são

719 incubadas com a lectina DBA, enquanto as ESVs dão resultado negativo
720 (MIDDLEJ et al., 2013).

721 É importante assinalar que ambas as vesículas são se encontram
722 presentes durante o processo de encistamento, desaparecendo no cisto maduro
723 e ausentes nos trofozoítos. No entanto, o mecanismo de junção de ambos os
724 conteúdos na formação da parede, bem como sua polimerização, ainda é um
725 mistério (MIDDLEJ et al., 2013; WAMPFLER et al., 2014).

726

727 **1.7.7. Mitossomos**

728 *G. intestinalis* não possui mitocôndrias típicas, mas apresenta uma
729 organela denominada mitossomo, considerada organela relíquia e
730 provavelmente desempenha funções que foram perdidas devido à anaerobiose
731 de *G. intestinalis* (TOVAR et al., 2003; MIDDLEJ et al., 2016). Os mitossomos não
732 apresentam muitas das funções mitocondriais típicas, como ciclo do ácido cítrico
733 e síntese de ATP. São organelas minúsculas, ovoides e envoltas por duas
734 membranas. Estudos mais recentes evidenciaram mitossomas com formas
735 alongadas, em trofozoítos e em células encistadas por 21 h, além de morfologia
736 diferente nos cistos maduros (REGOES et al., 2005; MIDDLEJ et al., 2016).

737 Ao contrário das mitocôndrias, as membranas internas dos mitossomos
738 não formam cristas e existem duas populações principais de mitossomas
739 descritos, os mitossomas centrais (CMs) que ficam localizados entre os dois
740 núcleos de *Giardia* e os axonemas dos flagelos, e os mitossomas periféricos
741 (MPs), distribuídos no restante do corpo da célula (TOVAR et al., 2003;
742 JEDELSKÝ et al., 2011; ROUT et al., 2016).

743 A biossíntese de clusters de ferro e enxofre é a única função mitocondrial
744 retida por essa organela e ao contrário das mitocôndrias, a divisão dos
745 mitossomos está sincronizada e limitada à mitose. Essas organelas também
746 apresentam Cpn60, mtHsp70 e ferredoxina (TOVAR et al., 2003; REGOES et
747 al., 2005; JEDELSKÝ et al., 2011; ROUT et al., 2016).

748

749 1.8. Histonas

750 O DNA genômico dos eucariotos geralmente é empacotado na forma de
751 cromatina, cuja estrutura controla os processos nucleares que envolvem o DNA
752 (**Figura 10**). Nucleossomos são as unidades básicas de compactação de DNA e
753 os constituintes fundamentais da cromatina que de acordo com os níveis de
754 compactação do DNA, ela pode ser classificada de duas formas: eucromatina
755 quando o DNA se encontra menos condensado, rico em genes sendo transcritos
756 ou heterocromatina quando o DNA está altamente condensado, e com poucos
757 ou nenhum gene sendo transcrito (KORNBERG, 1974; OSLEY, 1991;
758 HENNEMAN et al., 2018).

759 Essa compactação do DNA na cromatina é auxiliada por pequenas
760 proteínas (**Figura 11**) com carga positiva divididas em: histonas H2A, H2B, H3 e
761 H4 e histona de ligação (H1). Na maior parte dos eucariotos a porção central dos
762 nucleossomos apresentam dois dímeros de H2A-H2B e um tetrâmero H3-H4
763 onde o DNA é envolvido duas vezes e a histona de ligação H1 une os pontos de
764 entrada e saída (KORNBERG, 1974; OSLEY, 1991; MELLOR, 2006;
765 FYODOROV et al., 2017; HENNEMAN et al., 2018).

766 As histonas são proteínas básicas ricas em lisina e arginina, como dito
767 anteriormente estão associadas ao DNA e são conservadas entre os mais
768 diversos eucariotos. Os octâmeros das histonas apresentam dois domínios: o
769 domínio C-terminal, que se encontra dentro dos nucleossomos, e o domínio N-
770 terminal, localizado fora dessa estrutura (MELLOR, 2006; FYODOROV et al.,
771 2017; HENNEMAN et al., 2018; ZUMA e de SOUZA, 2018).

772 Além disso, as histonas (**Figura 11**) podem sofrer modificações pós-
773 traducionais (MPTs), especialmente em suas caudas livres formadas por
774 resíduos de lisina. Essas caudas são estruturas que se projetam dos
775 nucleossomos e são frequentemente referidos como “marcas epigenéticas”
776 porque podem conferir propriedades de expressão gênica que não são
777 estritamente dependentes da sequência de DNA (MELLOR, 2006; FYODOROV
778 et al., 2017; HENNEMAN et al., 2018).

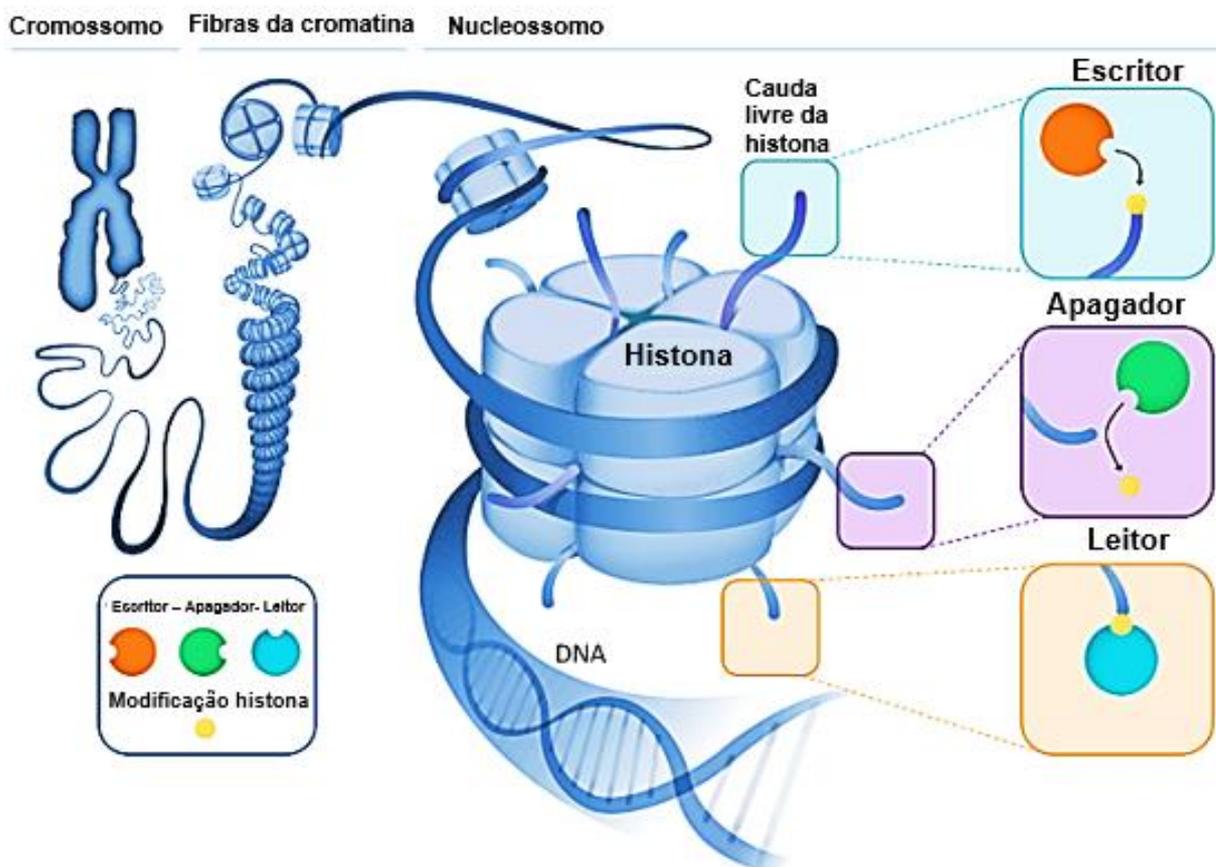
779 As MPTs de histonas regulam a participação do DNA nos processos de
780 transcrição, replicação, reparo e recombinação, e controlam a ligação de
781 proteínas específicas a nucleossomos através de domínios proteicos específicos

782 conhecidos como domínios ou módulos 'leitores'. Esses domínios podem
 783 modificar a cromatina, fazer parte de complexos que contêm ou recrutam
 784 enzimas que modificam as histonas pela adição de MPTs ('escritores') ou pela
 785 remoção de MPTs ('borrachas'). As principais MPTs são: acetilação, metilação,
 786 fosforilação, ubiquitinação e biotinylação (KORNBERG, 1974; OSLEY, 1991;
 787 MELLOR, 2006; HENNEMAN et al., 2018). Cerca de mais de 60 modificações
 788 pós-traducionais nas histonas já foram descritas na literatura, a maioria ocorre
 789 no domínio N-terminal da proteína. Contudo, vale ressaltar que o domínio
 790 globular também já foi descrito como um local dessas modificações.
 791 (HENNEMAN et al., 2018; ZUMA e de SOUZA, 2018)

792

793 **Figura 10: Esquema representativo da organização do DNA.**

794

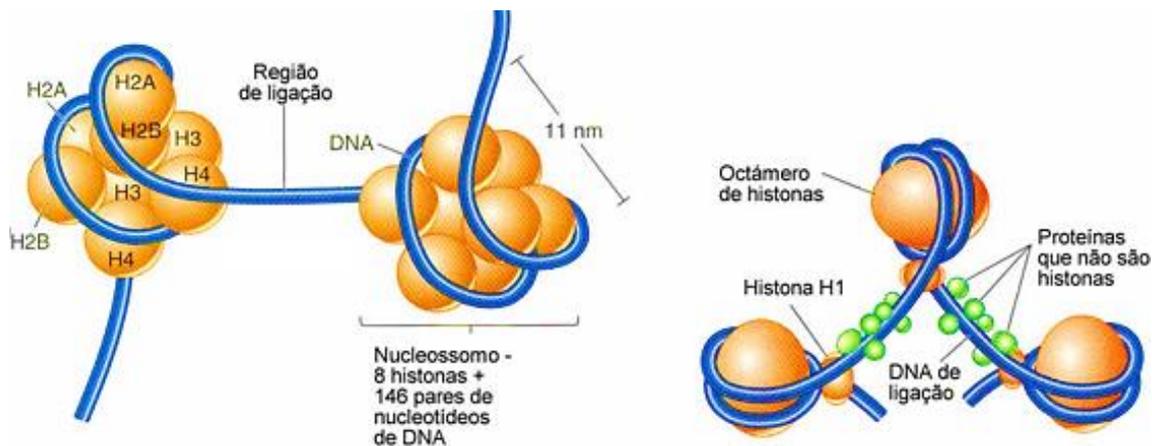


795

796

797 **Fonte:** <https://www.resverlogix.com/science-and-programs/epigenetics>

798 **Figura 11: Esquema representativo da organização das Histonas.**



799

800 **Fonte:** Flores, 2014. [http://uenf.br/cbb/lbt/files/2014/09/Estrutura-](http://uenf.br/cbb/lbt/files/2014/09/Estrutura-cromoss%C3%B4mica.pdf)
 801 [cromoss%C3%B4mica.pdf](http://uenf.br/cbb/lbt/files/2014/09/Estrutura-cromoss%C3%B4mica.pdf)

802

803 1.8.1. Acetilação e desacetilação das Histonas

804 A acetilação das histonas (**Figura 12**) é um processo dinâmico, reversível,
 805 e catalisado por dois grupos de enzimas: histona acetiltransferases (HATs) e
 806 histonas desacetilases (HDACs). Como consequência, a acetilação pode tornar
 807 a cromatina menos ou mais compacta, papel fundamental para realizar a
 808 transcrição de genes (SCHNEIDER et al., 2013; KURDISTANI e GRUNSTEIN
 809 2003).

810 As enzimas HATs (histona acetiltransferases) adicionam grupos acetil aos
 811 resíduos das lisinas (**Figura 12**), neutralizando as cargas positivas dos terminais
 812 N e causando uma redução em sua afinidade pelo DNA, induzindo a
 813 eucromatina. No entanto, as HDACs (histonas desacetilases) são responsáveis
 814 pela desacetilação das histonas (**Figura 12**), promovendo a remoção dos grupos
 815 acetil e, conseqüentemente, induzindo a heterocromatina (SCHNEIDER et al.,
 816 2013; KURDISTANI e GRUNSTEIN, 2003; HULL et al., 2016).

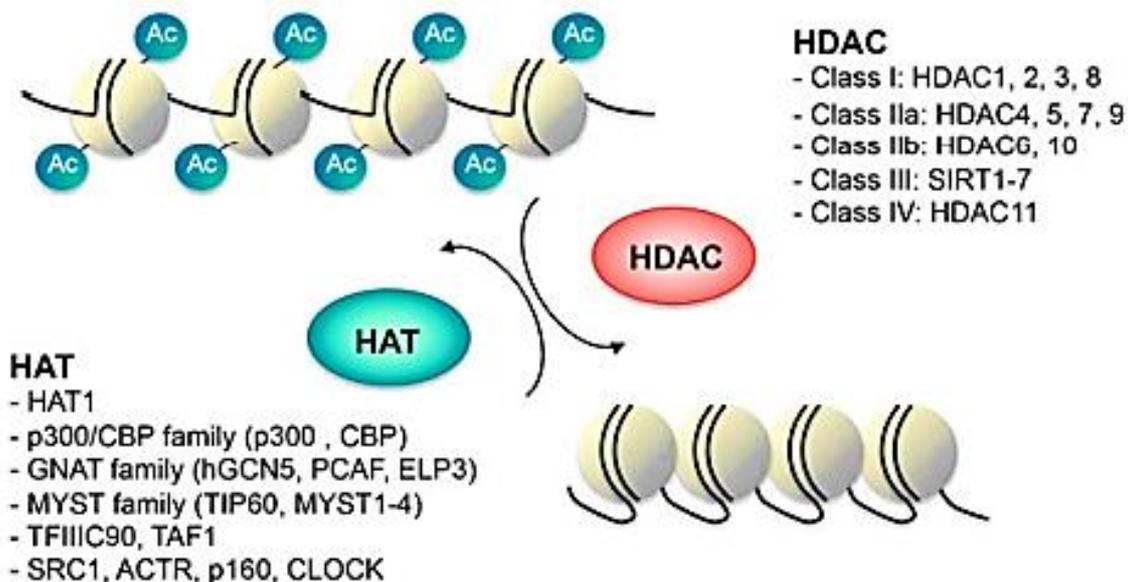
817 As HATs são subclassificadas em 5 famílias principais: (1) Gcn5-N-
 818 acetiltransferases relacionadas (GNAT), (2) p300/ proteína de ligação ao
 819 elemento de resposta a adenosina monofosfato cíclica (CREB) e proteína de
 820 ligação (CBP), (3) MOZ, levedura YBF2, SAS2 e TIP60 (MYST), (4) relacionados
 821 ao fator de transcrição HATs e (5) HATs associados ao receptor nuclear
 822 (SCHNEIDER et al., 2013; HULL et al., 2016). Já, as HDAC são divididas em
 823 quatro classes: as proteínas do tipo Rpd3 classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e

824 HDAC8); as proteínas do tipo Classe II Hda1 (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7,
 825 HDAC9 e HDAC10); as proteínas do tipo Sir2 classe III (SIRT1, SIRT2, SIRT3,
 826 SIRT4, SIRT5, SIRT6 e SIRT7); e a proteína classe IV (HDAC11) (KORNBERG,
 827 1974; OSLEY, 1991; SCHNEIDER et al., 2013; HULL et al., 2016).

828 Sabe-se ainda que a acetilação e a desacetilação de histonas levam a
 829 alterações moleculares que impactam na vida de diversos eucariotos. Nos seres
 830 humanos, essas enzimas estão diretamente relacionadas ao câncer, doenças
 831 neurológicas, distúrbios metabólicos, doenças inflamatórias, cardíacas,
 832 pulmonares entre outros. Por esse motivo, os inibidores de HDAC já são
 833 conhecidos agentes antineoplásicos que se mostram promissores no tratamento
 834 de muitas doenças e são foco de muitos estudos por pesquisadores de diversas
 835 áreas (HULL et al., 2016).

836

837 **Figura 12: Esquema da organização da cromatina.**



838

839

840 **Níveis de acetilação determinados pela interação dos mecanismos de**
 841 **acetilação e desacetilação, respectivamente, pelas enzimas HATs e**
 842 **HDACs. Ao lado as diferentes famílias e classes dessas enzimas. Fonte:**
 843 **SCHNEIDER et al., 2013.**

844

845

846

847 **1.8.2. Histonas em *G. intestinalis***

848 Na atualidade, as novas abordagens baseadas nas técnicas chamadas
849 de “ômicas” (transcriptômica, proteômica, metabolômica, lipidômica, entre
850 outras) se tornaram um grande apoio para expandir o conhecimento e
851 abrangência sobre a regulação genômica e a epigenética de vários organismos,
852 dentre eles o parasita *G. intestinalis* (WU et al., 2000; YEE et al., 2007; SONDA
853 et al., 2010).

854 Essas técnicas têm auxiliado na compreensão de alguns fatores da
855 biologia de *Giardia*, como as modificações que ocorrem nas histonas e que
856 regulam o ciclo celular, o encistamento/desencistamento o comportamento do
857 parasita após exposição à drogas (levando a morte ou a resistência às mesmas),
858 a sinalização no tráfego intracelular ou extracelular (interação parasita/
859 hospedeiro), nas resposta metabólica e em inúmeras outras funções celulares
860 essenciais do protozoário (WU et al., 2000; YEE et al., 2007; SONDA et al., 2010;
861 PRUCCA et al., 2011; LUJAN, 2011; CARRANZA et al., 2016).

862 *G. intestinalis* é um eucarioto típico, mas possui várias características que
863 revelam que ele é um dos representantes mais divergentes do seu grupo como,
864 por exemplo, o fato de não ter mitocôndrias morfologicamente ou
865 bioquimicamente típicas de outros eucariotos. Porém, apesar dessa grande
866 divergência biológica, *G. intestinalis* preserva outras estruturas como as
867 histonas, sustentando a ideia de que a organização típica da cromatina
868 eucariótica estaria presente em um ancestral comum a todos os eucariotos e que
869 sofreu pequenos ajustes durante sua evolução (WU et al., 2000; YEE et al., 2007;
870 SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011; LUJAN, 2011; CARRANZA et al.,
871 2016; GARGANTINI et al., 2016; SERRADELL et al., 2019).

872 O genoma de *Giardia* possui uma única classe de genes que codificam
873 histonas independentes de replicação. As histonas desse parasita assim como
874 em eucariotos superiores se arranjam em octâmeros onde o DNA se organiza
875 ao seu redor, formando assim os nucleossomos. Nesse parasita, as sequências
876 das quatro principais histonas (H2a, H2b, H3 e H4) em seu genoma são
877 representadas apenas por duas cópias, com exceção do gene H4, que está
878 presente em três cópias. Importante ressaltar que *Giardia*, ao contrário de outros

879 eucariotos, não apresenta histonas de ligação H1 (SONDA et al., 2010; PRUCCA
880 et al., 2011; CARRANZA et al., 2016).

881 Além disso, essas histonas possuem sítios canônicos para acetilação e
882 foi demonstrada a presença de genes que codificam as enzimas histonas
883 acetilases e desacetilases (SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011; LUJAN,
884 2011).

885 As histonas desacetilases (HDACs) de *Giardia* têm a inserção de quatro
886 aminoácidos (posição 283-286) não encontrada em outras espécies. Contudo, o
887 significado dos aminoácidos extras no HDAC de *Giardia* ainda é desconhecido
888 (SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011; LUJAN, 2011; CARRANZA et al.,
889 2016; SERRADELL et al., 2019), sabe-se apenas que inserções de aminoácidos
890 são comuns nas proteínas de *G. intestinalis* como exemplificado por Morrison e
891 colaboradores (2007).

892 Outro dado curioso sobre as HDAC em *Giardia* foi demonstrado por Sonda
893 e colaboradores (2010). Esses autores mostraram que alinhamentos de
894 múltiplas sequências de proteínas HDACs em *Giardia* possuem resíduos
895 importantes para atividades catalíticas envolvidos na ligação de zinco. Sabe-se
896 ainda que quatro resíduos da inserção específica nas HDACs em *G. intestinalis*
897 possui alto grau de conservação como em outros eucariotas (MORRISON et al.,
898 2007; SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011; CARRANZA et al., 2016;
899 GARGANTINI et al., 2016).

900 Outro dado importante nesse trabalho (SONDA et al., 2010) é que os
901 alinhamentos de sequências múltiplas mostraram ainda que existe um alto nível
902 de similaridade entre uma única HDAC de *Giardia* e ortólogos de espécies de
903 protozoários e metazoários, indicando que esta proteína é altamente conservada
904 neste parasita. Vale ressaltar que os aminoácidos considerados críticos para a
905 atividade de HDAC1 humana, incluindo os resíduos na bolsa catalítica que
906 coordenam a ligação ao cofator Zn^{2+} , também estão presentes em *G.*
907 *intestinalis* (MORRISON et al., 2007; SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011).

908

909 **1.8.2.1 Mecanismos epigenéticos na diferenciação *G. intestinalis***

910 Como já dito anteriormente, regular o processo gênico é um processo
911 complexo controlado por vários mecanismos moleculares, incluindo mudança na

912 estrutura da cromatina. Em termos gerais, o processo de acetilação de histonas
913 regula o genoma do parasita e isso é controlado pela atividade das enzimas
914 HATs e HDACs. As histonas desacetilases podem ser classificadas em
915 desacetilases independentes de NAD⁺ (ou simplesmente HDAC) e
916 desacetilases dependentes de NAD⁺ (Sirtuinas ou Sir2-like) (WU et al., 2000;
917 YEE et al., 2007; SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011; LUJAN, 2011;
918 CARRANZA et al., 2016; GARGANTINI et al., 2016; SERRADELL et al., 2019).

919 Sabe-se que as modificações epigenéticas podem induzir alterações na
920 expressão gênica desse parasita e as modificações específicas nessas histonas
921 participariam do controle da expressão gênica durante a adaptação de *G.*
922 *intestinalis* nas diferentes condições ambientais, além de auxiliar os mecanismos
923 que controlam a transcrição e a expressão simultânea de genes que codificam
924 proteínas variantes específicas de superfície (VSP) (LUJAN, 2011; CARRANZA
925 et al., 2016; GARGANTINI et al., 2016; SERRADELL et al., 2019).

926 Em *Giardia*, os níveis de acetilação atuam modulando o encistamento.
927 Estudos realizados por Carranza e colaboradores (2016) sugerem que a
928 atividade de um NAD⁺ independente desacetilase (gHDAC) e desacetilases
929 dependentes de NAD⁺ (gSirtuins) são importantes durante o processo de
930 encistamento embasando os achados de Sonda e colaboradores (2010), que
931 relataram que a inibição do encistamento por um inibidor da desacetilases
932 independente de NAD⁺ alterava o processo de diferenciação do parasita. Porém,
933 esses autores foram incapazes de especificar quando de fato as atividades das
934 HDACs são necessariamente indispensáveis para o encistamento (SONDA et
935 al., 2010; CARRANZA et al., 2016; GARGANTINI et al., 2016).

936 Outra importante função das HDACs é que estariam envolvidas na troca
937 das proteínas variantes específicas de superfície (VSP) que são proteínas de
938 membrana integrais, ricas em cisteína, com um único domínio transmembranar
939 hidrofóbico e uma cauda citoplasmática altamente conservada. As VSPs são
940 altamente resistentes à digestão proteolítica e ao pH, às temperaturas extremas
941 e estimulam as respostas imunes inatas do hospedeiro provavelmente devido à
942 sua capacidade de coordenar metais e formar ligações de dissulfeto intra e
943 intermoleculares. Dessa forma, acredita-se que as VSPs seriam capazes de
944 proteger os trofozoítos de *Giardia* da ação das proteases intestinais e das

945 respostas imunológicas do hospedeiro e que poderiam ser um dos principais
946 motivos das falhas e a perda da imunogenicidade do antígeno pelo hospedeiro
947 (LUJAN, 2011; CARRANZA et al., 2016; GARGANTINI et al., 2016; SERRADELL
948 et al., 2019).

949 Carranza e colaboradores (2016) também descreveram que as alterações
950 transcricionais durante a diferenciação dos estágios de trofozoíto - cisto -
951 trofozoíto estariam sob forte controle da epigenética e que a atividade das HDAC
952 poderia ser um alvo promissor para agentes farmacológicos, pois ao realizarem
953 testes com HDACi em trofozoítos de *G. intestinalis* houve o bloqueio na formação
954 de cistos e isso poderia reduzir a transmissão da doença pelo parasita e poderia
955 se tornar uma imaginável alternativa para novos tratamentos utilizando esta via
956 (CARRANZA et al., 2016; GARGANTINI et al., 2016; SERRADELL et al., 2019).

957

958 **1.9. Tratamento atual da doença**

959 Atualmente, o tratamento da giardíase consiste no uso de compostos
960 derivados da classe dos nitroimidazóis e da família dos benzimidazóis. O
961 metronidazol (Mtz) é o tratamento medicamentoso de primeira linha para vários
962 patógenos anaeróbicos, incluindo *G. intestinalis*. No entanto, a falha do
963 tratamento tem sido cada vez mais relatada. Mesmo que ainda tenha cerca de
964 73 a 100% de eficácia, têm ocorrido grandes relatos de resistência clínica ao
965 medicamento (chegando a ter 20% de prevalência no tratamento de viajantes e
966 40% de prevalência em tratamento em um ambulatório de referência em
967 Londres) e aumento da incidência do abandono ao tratamento (EMERY et al.,
968 2018; MULLER et al., 2018; SAGHAUG et al., 2019).

969 Introduzido inicialmente em 1950 para o tratamento da tricomoníase, em
970 *G. intestinalis*, o MTZ atua entrando no parasita por difusão passiva, é ativado
971 por redução enzimática; o composto nitro após ser reduzido se liga
972 covalentemente ao DNA resultando na quebra do DNA, liberando intermediários
973 tóxicos que provocam o mau funcionamento de proteínas, interrupção da divisão,
974 dano irreparável ao DNA e estresse oxidativo levando o parasita à morte
975 (SAGHAUG et al., 2019).

976 Existem várias causas aceitas para a ineficiência do tratamento com
977 metronidazol. As principais são: (1) a dificuldade de alguns pacientes em

978 conseguir suportar os desagradáveis efeitos colaterais que o medicamento
979 causa (dores de cabeça intensas, vertigens, náuseas, vômitos, gosto metálico
980 na boca); (2) o uso prolongado que em casos graves pode ocasionar pancreatite,
981 toxicidade do sistema nervoso central, neurogenia reversível e neuropatia
982 periférica (KIM et al., 2004) e (3) o fato de que os compostos de nitro,
983 especificamente o metronidazol, têm sido utilizados na clínica por mais de 50
984 anos como terapia e isso tem causado cada vez mais a seleção de população
985 de *G. intestinalis* resistente ao fármaco. Alguns estudos inclusive associam essa
986 resistência ao alto controle da expressão gênica e regulação pós-transcricional
987 e pós-tradução que esse parasita faz (MULLER et al., 2018; SAGHAUG et al.,
988 2019).

989 Além disso, como apontado pelo FDA (*U.S. Food & Drug Administration*)
990 o metronidazol pode causar tumores que afetam o fígado, pulmão, tecidos
991 mamários e linfáticos em ratos e camundongos e também pode levar à atividade
992 mutagênica em sistemas de ensaio *in vitro*, incluindo o teste de ames (FDA,
993 2018).

994 A segunda medicação de escolha para o tratamento da giardíase é o
995 albendazol, que atua inibindo a polimerização da tubulina, afetando todas as
996 estruturas formadas por microtúbulos, levando a alterações no citoesqueleto de
997 *G. intestinalis* e conseqüentemente a morte (MACDONALD et al., 2004). Possui
998 eficácia de 83–96% apenas quando combinados com medicamentos de
999 diferentes classes, pois a monoterapia com albendazol tem se mostrado pouco
1000 eficaz. O tratamento com esse medicamento pode ser realizado em dose única
1001 ou três vezes ao dia por até 7 dias e tem efeitos colaterais como náuseas,
1002 vômitos, diarreia e dor abdominal (MORCH e HANEVIK, 2020). Outra questão
1003 importante que deve ser mencionada é que o albendazol pode ser teratogênico,
1004 e o FDA recomenda cautela na administração deste medicamento nas mulheres
1005 em idade fértil (FDA, 2018).

1006

1007 **1.10. Inibidores de histonas desacetilases e suas utilizações na terapêutica** 1008 **atual**

1009 As enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases
1010 (HDACs), como dito anteriormente, controlam o equilíbrio da acetilação das

1011 proteínas histonas e, assim, ajudam a regular a estrutura e a transcrição da
1012 cromatina através da dinâmica dos nucleossomos, fatores de transcrição e
1013 outras proteínas de ligação ao DNA (SCHNEIDER et al., 2013; HULL et al.,
1014 2016).

1015 A capacidade das HDAC de desacetilar histonas e assim alterar a
1016 cromatina geralmente é considerada como a atividade primária, entretanto, elas
1017 também removem os grupos acetil de mais de 1750 proteínas não-histonas e
1018 de sinalização celular. As funções celulares de proliferação, diferenciação e
1019 autofagia também são governadas por HDACs na maioria dos eucariotos
1020 (MCCAW et al., 2017; MRAKOVCIC et al., 2017; HARRISON et al., 2018).

1021 Adicionalmente, as HDACs também estão relacionadas a uma variedade
1022 de doenças, principalmente no câncer (côlon, mama, próstata, neuroblastoma,
1023 meduloblastoma e carcinoma pancreático). Sabe-se que no câncer, através de
1024 mecanismos não totalmente elucidados, ocorre o recrutamento equivocado e o
1025 direcionamento de genes que causam a super-expressão, mutações ou
1026 inativação das HDACs e isso tem papel crucial no desenvolvimento do tumor.
1027 Em reconhecimento desse fenômeno, inibidores de HDAC (HDACi) foram
1028 inicialmente propostos como drogas anticâncer, com a esperança de induzir a
1029 diferenciação celular e apoptose, e parar o crescimento dessas células anormais
1030 pois, uma vez que os HDACi impedem a desacetilação de proteínas histonas e
1031 não histonas, induzem o relaxamento da cromatina, provocando a expressão de
1032 genes que regulam os processos importantes nessas células tumorais
1033 (HUBBERT et al., 2002; BUTLER et al., 2010; HAKAMI, et al., 2016;
1034 SCHNEIDER et al., 2013; MCCAW et al., 2017; MRAKOVCIC et al., 2017;
1035 HARRISON et al., 2018).

1036 De maneira mais geral, os HDACi exercem efeitos antitumorais por meio
1037 de vários mecanismos. Não se limitam somente ao remodelamento da
1038 cromatina, são uma classe bem caracterizada de agentes terapêuticos contra o
1039 câncer e têm atividade clínica promissora contra tumores hematológicos e
1040 sólidos em doses bem toleradas pelos pacientes. De acordo com sua natureza
1041 química, podem ser agrupados em quatro classes diferentes: os que contêm
1042 hidroxamatos, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos e benzamidas (HUBBERT et

1043 al., 2002; MCCAWE et al., 2017; MRAKOVČIĆ et al., 2017; HARRISON et al.,
1044 2018).

1045 Muitos desses inibidores já estão comercialmente disponíveis, como por
1046 exemplo os HDACi pertencentes à classe dos hidroxamatos, a TSA (Tricostatina
1047 A) que afeta a expressão de NADPH oxidase (Nox4) em células endoteliais; o
1048 SAHA (ácido suberoil hidroxâmico) que também é um hidroxamato e atua nas
1049 células tumorais possivelmente induzindo a autofagia entre outras funções; o
1050 FK228, também denominado depsipeptídeo, romidepsina ou istodax da classe
1051 dos tetrapeptídeos cíclicos; os MS-275 e os MGCD0103 (mocetinostat) que são
1052 exemplos de HDACi da classe dos benzamidas, entre outros inibidores já
1053 disponíveis, testados e utilizados no tratamento de diversas enfermidades
1054 (HUBBERT et al., 2002; BUTLER et al., 2010; HAKAMI, et al., 2016; MCCAWE et
1055 al., 2017; MRAKOVČIĆ et al., 2017; HARRISON et al., 2018).

1056 Atualmente, outro inibidor potente que atua nas vias das HDAC são os
1057 inibidores de sirtuínas-desacetilases (SIRT). A nicotinamida vem sendo
1058 amplamente estudada, pois sabe-se que inibe de maneira não seletiva as
1059 HDACs de classe III, inibindo as sirtuínas 1-7, mas, ainda pouco se sabe sobre
1060 as consequências biológicas da inibição das sirtuínas. No entanto, o
1061 desenvolvimento de inibidores específicos contra a atividade da SIRT pode se
1062 tornar uma área promissora de pesquisa em relação à terapêutica antineoplásica
1063 e de outras doenças (HUBBERT et al., 2002; BUTLER et al., 2010; HAKAMI, et
1064 al., 2016; SCHNEIDER et al., 2013; MCCAWE et al., 2017; MRAKOVČIĆ et al.,
1065 2017; HARRISON et al., 2018, GADELHA et al., 2019).

1066 O mecanismo preciso pelo qual os HDACi eliminam células malignas
1067 ainda é uma questão de pesquisa, mas a morte celular mediada por HDACi é
1068 iniciada pela hiperacetilação de proteínas histonas e não histonas. A
1069 hiperacetilação resulta em uma estrutura de cromatina com possível atividade
1070 transcricional enquanto só a acetilação de proteínas não histonas pode promover
1071 o início da apoptose modulando a função das proteínas, alterando a estabilidade,
1072 localização celular e as interações proteína-nucleotídeo / proteína-proteína
1073 (BUTLER et al., 2010; CAMPO, 2017).

1074 HDACi atuam em proteínas estruturais e chaperonas, proteínas de
1075 importação nuclear, mediadores de sinalização, co-reguladores da transcrição,

1076 receptores nucleares de ligação ao DNA e fatores de transcrição como os NF-
1077 κ B, p53 e STATs, que são transdutores de sinais e ativadores da transcrição,
1078 podem alterar a ligação do DNA e ainda alterar a capacidade das células de
1079 realizar mitose. Há ainda os inibidores que agem sobre desacetilases
1080 citoplasmáticas, que atuam de maneira seletiva sobre algumas enzimas,
1081 provocando uma hiperacetilação de tubulina e gerando efeitos diversos em
1082 diferentes linhagens celulares (BUTLER et al., 2010; HUBBERT et al., 2002;
1083 MRAKOVČIĆ et al., 2017; HARRISON et al., 2018).

1084 Por esta razão, nos últimos anos, uma variedade ampla de testes com
1085 HDACi em protozoários tem demonstrado grande potencialidade quimioterápica.
1086 Descobriu-se que os processos de acetilação e desacetilação de proteínas do
1087 citoesqueleto em protozoários podem ocasionar alterações importantes,
1088 principalmente quanto ao papel dos microtúbulos na manutenção da forma, na
1089 divisão, na diferenciação celular e em outros eventos biológicos essenciais para
1090 a maioria dos parasitas (HUBBERT et al., 2002; BUTLER et al., 2010; HAKAMI,
1091 et al., 2016; ENGEL et al., 2015; CAMPO, 2017; HARRISON et al., 2018).

1092 Estudos recentes reportam a atividade das HDACi como eficiente
1093 leishmanicida (VERÇOZA et al., 2017). Outros trabalhos reportaram uma
1094 diminuição na proliferação, modificações no ciclo celular e na ultraestrutura dos
1095 parasitas *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* e *G. intestinalis* (SONDA
1096 et al., 2010; VEIGA-SANTOS et al., 2014; ENGEL et al., 2015; CAMPO, 2017;
1097 de OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; GADELHA et al., 2019). Desta forma, a
1098 utilização de HDACi contra protozoários demonstra ser um campo promissor
1099 para estudos e pesquisas (VEIGA-SANTOS et al., 2014; ENGEL et al., 2015;
1100 CAMPO, 2017; GADELHA et al., 2019).

1101

1102 2. JUSTIFICATIVA

1103 Giardíase é uma doença de distribuição universal causada pelo
1104 protozoário *G. intestinalis*. Em detrimento ao pouco investimento que é feito no
1105 combate dessa enfermidade, bem como poucas medidas de promoção,
1106 prevenção e proteção à saúde conforme preza os princípios da atenção básica
1107 do Sistema Único de Saúde SUS, no Brasil, a giardíase é uma doença que
1108 possui alta prevalência, acomete pessoas de todas as classes sociais e faixas
1109 etárias podendo se agravar principalmente em crianças na fase pré-escolar e
1110 pessoas com baixo poder socioeconômico. Ainda nesse contexto, o cenário é
1111 agravado pelo fato de que o tratamento vem se demonstrando falho ao longo dos
1112 anos, ocorrendo aumento dos relatos de casos de resistência ao metronidazol
1113 que é medicamento de escolha para o tratamento. Além disso, esse
1114 medicamento possui efeitos colaterais que causam entre outras coisas gosto
1115 metálico na boca, e não é recomendado que grávidas utilizem este
1116 medicamento, fazendo com que muitos pacientes desistam do tratamento com
1117 este fármaco.

1118 Diante do exposto acima, se torna evidente a necessidade da busca por
1119 novos estudos para tratamento alternativo e mais efetivo contra *G. intestinalis*.
1120 Diante da escassez de novos fármacos no mercado, de maneira geral os
1121 inibidores das enzimas histonas desacetilases (HDACi), inicialmente utilizados
1122 no tratamento contra o câncer, vêm sendo testados como forma de tratamento
1123 contra várias outras doenças. Além disso, estão há décadas comercialmente
1124 disponíveis, tem uma boa atividade antiparasitária contra *Trypanosoma brucei* e
1125 *Plasmodium falciparum*, e possuem um baixo efeito citotóxico em células
1126 saudáveis humanas. Dessa forma, no presente estudo, testamos HDACi de
1127 classe I e II, denominados KV-24, KV-30, KV-46 e KV-50 no parasita *G.*
1128 *intestinalis*. Os compostos KV-30 e KV-50 inibem as duas classes (I e II), o
1129 composto KV-46 é mais seletivo para classe II e a ação do composto KV-24
1130 ainda não é definida. Esses compostos foram sintetizados pelo grupo do Dr.
1131 Franz Bracher, da Universidade de Munique, Alemanha, e gentilmente cedidos
1132 ao nosso grupo na tentativa de encontrar uma possível alternativa efetiva para o
1133 tratamento da Giardíase.

1134 **3. OBJETIVOS**

1135

1136 **3.1. Objetivo Geral**

1137 Verificar se os inibidores de histonas desacetilases poderiam servir como
1138 droga potencial no desenvolvimento de fármacos alternativos para o
1139 tratamento da giardíase.

1140

1141 **3.2. Objetivos específicos**

1142 • Avaliar a ação dos inibidores das enzimas histonas desacetilases (HDACi)
1143 na proliferação e viabilidade dos trofozoítos de *G. intestinalis*.

1144 • Verificar se ocorre efeito citotóxico HDACi nas células de linhagem
1145 epitelial do intestino humano (CACO -2).

1146 • Analisar se os compostos interferem na adesão e motilidade parasitária.

1147 • Avaliar possíveis alterações ultraestruturais dos trofozoítos de *G.*
1148 *intestinalis* tratados com HDACi.

1149 • Verificar se os compostos interferem no ciclo celular do protozoário.

1150 • Analisar se os compostos ativariam os mecanismos de morte celular por
1151 autofagia e/ou apoptose.

1152

1153 **4. METODOLOGIA**1154 **4.1. Cultivo de *G. intestinalis***

1155 Para todos os experimentos, foram utilizados trofozoítos de *G. intestinalis*
 1156 da cepa WB (*American Type Culture Collection*, ATCC 30957, EUA), na fase
 1157 logarítmica de crescimento entre 24 h e 48 h pós subcultivo (1×10^7) de células.
 1158 Os parasitas foram cultivados em tubos cônicos de 15 mL, contendo o meio TYI-
 1159 S-33 (**Quadro 2**) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) das marcas
 1160 Vitrocell ou Gibco (América do Sul). As culturas foram mantidas em estufas a
 1161 37°C por 72 horas e os subcultivos foram feitos duas vezes por semana, após o
 1162 terceiro em cultura.

1163 **Quadro 2: Componentes do meio TYI-S-33 para cultivo de *G. intestinalis***

Componentes do meio TYI		
Reagente	Concentração	Empresa/ País
Tripitone	2 %	Sigma-Aldrich, USA
Extraído de levedura	1 %	BD, França
Glicose	1 %	Vetec, Brasil
Ácido Ascórbico	0,02 %	Sigma-Aldrich, USA
Fosfato de potássio monobásico	0,06 %	Vetec, Brasil
Fosfato de potássio dibásico	0,12 %	Vetec, Brasil
L-cisteína	0,2 %	Sigma-Aldrich, USA
Bile Bovina	0,1 %	Sigma-Aldrich, USA
Cloreto de sódio	0,2 %	Vetec, Brasil

1164 4.2. Cultivo das células intestinais humanas

1165 As células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2 (*Caucasian Colon*
 1166 *Adenocarcinoma*; ® HTB37; *American Type Culture Collection*) foram cultivadas
 1167 em meio *DMEM High Glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Gibco, EUA)
 1168 (Quadro 3) acrescido de 10% de soro fetal bovino, a 37°C em uma atmosfera de
 1169 5% de CO₂. Essas culturas tiveram o meio suplementado com 10% de soro fetal
 1170 bovino e 1% de antibiótico (*Penicillin-Streptomycin* 10000 U/mL, Gibco,
 1171 ref.:15140122), foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂.
 1172 O subcultivo foi feito a cada cinco dias, utilizando garrafas plásticas de 25 cm²
 1173 (*Eppendorf*, Alemanha), trocando-se o meio a cada 72 h. Ao atingirem
 1174 confluência, as células foram ressuspensas pela ação da solução enzimática
 1175 tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, ref.: 25300054) por 2 a 5 minutos a 37°C Para a
 1176 realização dos experimentos, as células em suspensão foram contadas e
 1177 semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade celular de 4 x 10³
 1178 células/poço.

1179 Quadro 3: Componentes do meio para cultivo das células de mamíferos 1180 CACO-2.

Componentes do meio de cultivo das células CACO-2		
Reagente	Concentração	Empresa/ País
DMEM High Glucose	X mL	Gibco, USA
Soro Fetal Bovino	10 %	Gibco/ Vitrocell, América do Sul
L-Glutamina	1 %	Sigma-Aldrich, Brasil

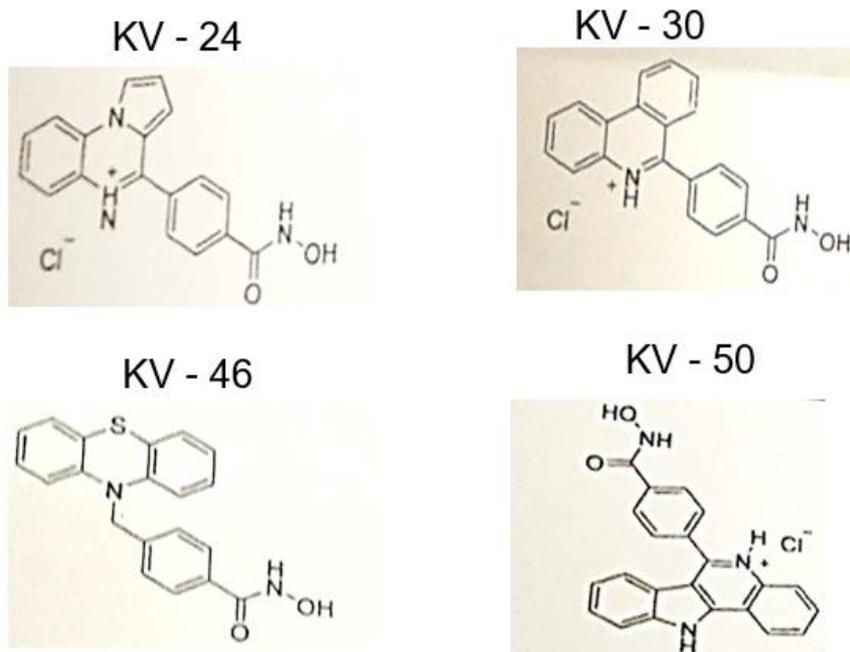
1181

1182 4.3. Compostos

1183 Os inibidores das enzimas histonas desacetilases (**Figura 13**) (HDAi) KV-
 1184 24, KV-30, KV-46 e KV-50 utilizados neste estudo foram sintetizados pelo grupo
 1185 do Dr. Franz Bracher (*Department of Pharmacy, Center for Drug Research,*
 1186 *Ludwig-Maximilians-Universität München*, em Munique, Alemanha). Os
 1187 compostos possuem um grupo de hidroxamato, que é um conhecido HDACi
 1188 dependente de zinco. Foram projetados baseando-se no já comercialmente
 1189 disponível inibidor da HDAC6, a *Tubastatin A*. Estes compostos foram

1190 solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração estoque de 10 mM e
 1191 mantidos a -20°C . As concentrações finais utilizadas nos ensaios abaixo
 1192 descritos foram de 1 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM diluídos respectivamente em
 1193 0,01%, 0,05%, 0,1% e 0,2% de DMSO (Sigma, EUA).

1194 **Figura 13: Estrutura química dos compostos testados**



1195

1196 4.4. Curva de crescimento

1197 Os trofozoítos (10^5 células/mL) foram cultivados em microtubos de 1,5 mL
 1198 (*Eppendorf*, Alemanha) contendo meio TYI-S-33 suplementado com 10% de
 1199 soro fetal bovino. Os HDACi foram adicionados às culturas no tempo de 0 h nas
 1200 concentrações de 1 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM . O DMSO (*Sigma*, EUA) foi
 1201 utilizado como controle negativo na concentração de 0.2% (uma vez que o
 1202 DMSO é o diluente dos compostos e esta foi a maior concentração utilizada para
 1203 diluição. Já o metronidazol (*Sigma-Aldrich*, Brasil) foi utilizado como droga
 1204 padrão de escolha para comparação na concentração de 10 μM . As culturas
 1205 tratadas e não tratadas foram mantidas em estufa a 37°C por 24h, 48h e 72 h.
 1206 Após estes intervalos, os microtubos (*Eppendorfs*, Alemanha) contendo os
 1207 parasitas controles e tratados foram vigorosamente agitados, centrifugados
 1208 (Centrífuga *Eppendorf*, Alemanha, rotor: 5427) por 5 min, 150 g, posteriormente

1209 diluídos 1:10 em formaldeído 4% nascente (*Merck*, Alemanha) em tampão
1210 fosfato, pH 7.2. As células foram contadas usando um hemocitômetro (câmara
1211 de *Neubauer*). As contagens foram realizadas no microscópio óptico Leica
1212 DM500 ou Zeiss AXIO Lab.A1 na objetiva de 20x.

1213 As curvas de crescimento do parasito foram elaboradas a partir da
1214 seguinte fórmula: $(A \div 4) \times B \times C$ onde **A** = N° de células contadas e somadas
1215 nos quatro quadrantes da Câmara de *Neubauer*; **B** = 10^4 (Fator da Câmara de
1216 *Neubauer*); **C** = Fator de diluição utilizada ou não. Os experimentos foram
1217 realizados em triplicatas independentes e os resultados foram analisados
1218 através da utilização do programa analítico *GraphPad Prism 7.00* (EUA).

1219 **4.5. Ensaio de viabilidade dos trofozoítos**

1220 **4.5.1. Ensaio de viabilidade com MTS/PSM**

1221 Para avaliar os efeitos dos inibidores na viabilidade celular de *G.*
1222 *intestinalis*, células foram cultivadas nas mesmas condições descritas para o
1223 ensaio anterior (4.4). Após 24 h ou 48 h, os microtubos (*Eppendorf*, Alemanha)
1224 contendo os parasitas controles e tratados foram vigorosamente agitados, em
1225 seguida, centrifugados (Centrífuga 5427 R) por 5 min à 150 g, ressuspensos em
1226 500 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2, suplementada
1227 com 10 mM de glicose. Uma alíquota de 100 µL foi distribuída por poço em placa
1228 de 96 poços em triplicada, para cada condição. Como controle negativo, 3 poços
1229 de células não tratadas também foram fixados com 0,4% de formaldeído. Depois,
1230 20 µL de uma solução de PMS/MTS (50 µL da solução estoque do PMS
1231 (*Promega*) em 1 mL da solução estoque do MTS (*Promega*) foi adicionada em
1232 cada poço (concentração final de MTS com 40 µg (333 µg/mL) e PMS com 0,92
1233 µg (25 µM) por poço. As amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas na
1234 ausência de luz. As análises foram realizadas usando o comprimento de onda
1235 de 490 nm no leitor de placas *Molecular Devices Microplate Reader* ou *Spectra*
1236 *Max Molecular Devices M2e* que avalia o comprimento da onda emitida
1237 do produto colorido solúvel formazan, resultado da reação enzimática nas
1238 células. Em células viáveis, o reagente PMS é reduzido e seus elétrons são
1239 transferidos para o MTS, que é convertido por desidrogenases em formazan (um

1240 composto solúvel em água), modificando a cor do substrato de modo
1241 proporcional ao número de células viáveis (HENRIQUES et al., 2011).

1242 **4.5.2. Ensaio de viabilidade com diacetato de fluoresceína e iodeto de** 1243 **propídio**

1244 Para avaliar os efeitos dos inibidores na viabilidade celular de *G.*
1245 *intestinalis*, células foram cultivadas nas mesmas condições descritas para o
1246 ensaio anterior (item 4.5.1) Após 24, 48 e 72 h, os microtubos (*Eppendorf*,
1247 Alemanha) contendo os parasitas controles e tratados foram vigorosamente
1248 agitados e, em seguida, centrifugados (Centrífuga *Eppendorf*, Alemanha, rotor:
1249 5427) por 5 min à 150 g, ressuspensos em 100 µL do próprio meio. Depois foi
1250 adicionado 0,4 µL (4 µM/ml) de diacetato de fluoresceína (Diacetato DAF-FM)
1251 (diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína) (*Invitrogen*, EUA).
1252 O DAF-FM é um reagente usado para detectar e quantificar baixas
1253 concentrações de óxido nítrico (NO). É essencialmente não fluorescente até que
1254 reaja com o NO para formar um benzotriazol fluorescente. A fluorescência verde
1255 é um indicador de células que têm atividade. Na sequência foi adicionado 0,1 µL
1256 (2 µg/mL) de iodeto de propídio (PI). Após adicionar os marcadores, as células
1257 foram homogenizadas. Três minutos depois, uma alíquota de células foi
1258 colocada em uma lâmina, foi gentilmente coberta com uma lamínula e
1259 visualizadas de imediato no microscópio de fluorescência (*Axiophot II – Zeiss*,
1260 Alemanha). Um total de 100 células foram contadas. Os resultados foram
1261 analisados através da utilização do programa analítico GraphPad Prism 7.00
1262 (EUA).

1263 **4.6. Análise da toxicidade em células de mamíferos**

1264 As células Caco-2 (2×10^4 células/ml) foram cultivadas em placas de 96
1265 poços com meio DMEM acrescido dos 10% SFB com um volume final de 200
1266 µL por poço em triplicata. O composto KV-46 foi adicionado 24 h após o
1267 plaqueamento das células Caco-2, nas concentrações de 1 µM, 5 µM e 10 µM;
1268 o DMSO 0.2% (*Sigma*) foi utilizado como controle negativo. As culturas foram
1269 mantidas por mais 48 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, contabilizando
1270 72 h totais de plaqueamento das células e 48 h de incubação com o composto

1271 KV-46. Após, todo o meio DMEM foi retirado e a células foram lavadas em 300
1272 μ L de PBS com 10 mM de glicose, pH 7.2. Depois os poços foram preenchidos
1273 com 100 μ L dessa mesma solução e o controle negativo foi realizado utilizando
1274 três poços de células (não tratadas) fixados com 4% de formaldeído nascente
1275 (*Vetec*, Brasil). Vinte microlitros de uma solução de PMS /MTS ([3-(4,5-
1276 dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H
1277 tetrazolium]; metossulfato de fenazina) (50 μ L da solução estoque do PMS
1278 (*Promega*, *Technical Bulletin*) em 1 mL da solução estoque do MTS (*Promega*,
1279 *Technical Bulletin*) foi adicionada em cada poço (concentração final de MTS a 40
1280 μ g (333 μ g/mL) e PMS a 0,92 μ g (25 μ M por poço). As amostras foram incubadas
1281 a 37°C por 2 h na ausência de luz em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. As
1282 análises foram realizadas usando o comprimento de onda de 490 nm no leitor de
1283 placas *Molecular Devices Microplate Reader* ou *Spectramax®* (*Molecular*
1284 *Devices M2*, EUA) e que avalia o comprimento da onda emitido pelo substrato
1285 das células.

1286 **4.7. Citometria de Fluxo**

1287 **4.7.1. Ensaio para avaliação do ciclo celular**

1288 Os trofozoítos de *G. intestinalis* (10⁵ células/mL) foram cultivados em
1289 microtubos de 1,5 mL contendo meio TYI-S-33 suplementado com 10% de SBF.
1290 Os inibidores foram adicionados às culturas no tempo de 0 h nas concentrações
1291 de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. Após 24 h de incubação com os compostos, as
1292 células foram coletadas por centrifugação (Centrífuga Eppendorf, Alemanha, R:
1293 5427) por 5 min; 238 x g e lavadas com PBS, pH 7.2. Depois, foram
1294 permeabilizadas com Triton X-100 1% (TM X-100 *Sigma-Aldrich*, Brasil) em PBS
1295 durante por 10 min. As amostras foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas
1296 em 500 μ L de PBS contendo RNase 50 μ g/ml (*Sigma*, EUA) e incubadas a 37°C
1297 por 30 min. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e
1298 ressuspensas em 500 μ L de PBS contendo 2 μ g/mL de Iodeto de Propídio (PI)
1299 (*Molecular Probes*, EUA). Os dados foram coletados no citômetro *BD Accuri C6*
1300 (EUA) controlado pelo software *BD Accuri C6* (*BD Biosciences*, CA, EUA).

1301

1302 **4.8. Imunofluorescência**

1303 Os trofozoítos de *G. intestinalis* (10^5 células/mL) foram cultivados em
1304 microtubos de 1,5 mL (*Eppendorf*, Alemanha) contendo meio TYI-S-33
1305 suplementado com 10% SFB. Os inibidores KV-46 foram adicionados às culturas
1306 nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. Após 48h de incubação as
1307 células foram aderidas em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina.
1308 Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS pH 7.4 e fixadas com 4%
1309 formaldeído (Merck, Alemanha) em tampão PHEM (5 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 20
1310 mM HEPES, 60 mM Pipes e 10 mM EGTA) ou tampão fosfato pH 7.2 durante 10
1311 min. Em seguida, os parasitas foram lavados em PBS pH 7.4, e permeabilizados
1312 com Nonidet NP-40 2% (Sigma-Aldrich, Brasil) durante 40 min. Após a lavagem
1313 em PBS pH 8.0, as células foram incubadas com tampão de bloqueio, PBS com
1314 cloreto de amônio 50 mM, pH 8.0, por 30 min e PBS contendo 3% de albumina
1315 de soro bovino (PBS/BSA; Sigma-Aldrich, Brasil), pH 8.0, por mais 1 h. Após esta
1316 etapa, as células foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-
1317 tubulina acetilada 1:100 (Thermo Fisher; EUA) por 5 h em câmara úmida, na
1318 estufa a 37°C na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram lavadas em
1319 PBS/BSA, pH 8.0 e incubadas durante 2 h com o anticorpo secundário Alexa 488
1320 *anti-mouse* 1:400 (Thermo Fisher, EUA), durante 2 h na ausência de luz. As
1321 células foram lavadas três vezes e incubadas com DAPI 1:800 por 30 minutos
1322 na ausência de luz. As amostras foram observadas em microscópio de
1323 fluorescência Axiophot II (Zeiss, Alemanha).

1324 **4.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

1325 Para avaliar a ultraestrutura dos trofozoítos de *G. intestinalis*, as culturas-
1326 controle de *G. intestinalis* (10^5 células/mL) foram cultivadas em microtubos
1327 (*Eppendorf*, Alemanha) de 1,5 mL contendo meio TYI-S-33 suplementado com
1328 10% de soro fetal bovino. Os inibidores foram adicionados às culturas no tempo
1329 de 0h nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. Após 48h de incubação
1330 com os compostos, as culturas foram lavadas em PBS, pH 7.2 e, posteriormente,
1331 fixadas por 1 hora em uma solução contendo glutaraldeído (*Electron Microscopy*
1332 *Sciences*, EUA) 2.5%, em tampão cacodilato (0,1M), pH 7.2. Logo após, foram

1333 centrifugadas a 1.000xg, por 5 min, todo o sobrenadante foi retirado e células
1334 foram, então, lavadas novamente em PBS e pós-fixadas em solução contendo
1335 tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, em tampão cacodilato
1336 0,1 M por 30 min, na ausência de luz. Após a pós-fixação, as amostras foram
1337 lavadas 3 vezes com PBS pH 7.2, e desidratadas em soluções progressivas de
1338 acetona (*Merck*, Alemanha) (50%, 70%, 90%, 100% e realizado 3 trocas com
1339 acetona super-seca), deixando as amostras por 15 min em cada etapa. As
1340 células foram então infiltradas em resina epóxi (*PolyBed 812*, *Electron*
1341 *Microscopy Sciences*, EUA). A infiltração foi feita gradualmente por misturas de
1342 acetona:epon 2:1 por 6 h, 1:1 e 1:2 por 8 h e resina pura por 12 h, posteriormente
1343 o material foi colocado em moldes e polimerizado na estufa a 60°C, por 72 h.
1344 Depois de polimerizados, os blocos foram trimados, seccionados com uma faca
1345 de diamante (*Drukker*, Reino Unido) no ultramicrótomo *Leica* (Alemanha)
1346 *ULTRACUT UCT6* ou *7* e coletados em grades de cobre de 300 *mesh*. Os cortes
1347 ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 5% em água por 40 minutos
1348 e em citrato de chumbo por 3 minutos e visualizados ao microscópio eletrônico
1349 de transmissão *FEI Tecnai Spirit* (*FEI*, Holanda), operando a 80 kV.

1350 **4.10. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM)**

1351 Para avaliar a morfologia de superfície dos trofozoítos, *G. intestinalis* (10⁵
1352 células/mL) foram cultivados em microtubos (*Eppendorf*, Alemanha) de 1,5 mL
1353 contendo meio TYI-S-33 suplementado com 10% SFB. Os inibidores foram
1354 adicionados às culturas no tempo de 0h nas concentrações de 1 µM, 5 µM, 10
1355 µM e 20 µM. Após 48h de incubação já com os compostos, os microtubos
1356 (*Eppendorf*, Alemanha) contendo os parasitas controles e tratados foram
1357 vigorosamente agitados e, em seguida, centrifugados (Centrífuga *Eppendorf*,
1358 Alemanha, rotor: 5427) por 5 min 150 x g. As células, foram aderidas em
1359 lamínulas com poli-L-lisina 0,1% (*Sigma*, EUA) por 15 min e fixadas por 1 h em
1360 uma solução contendo glutaraldeído (*Electron Microscopy Sciences*, EUA) 2,5%
1361 em tampão cacodilato (0,1M) por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas
1362 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 30 min,
1363 na ausência de luz. Após esse procedimento, as amostras foram lavadas em
1364 PBS pH 7.2 por 3 vezes e desidratadas em soluções progressivas de etanol

1365 (Merck, Alemanha) (15%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% e super-seco
1366 por duas vezes) por 15 min cada série. Posteriormente, foram secas pelo método
1367 de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030, Alemanha) ou (Leica CPD 300, Alemanha),
1368 em seguida, foram montadas em suportes metálicos para MEV (*stubs*) e
1369 recobertas com 2 nm de platina em metalizador FL-9496 (Balzers Union). O
1370 material foi observado no microscópio eletrônico de varredura de alta resolução
1371 FEI Quanta FEG 450 (FEI, Holanda), operando a 15 kV.

1372 **4.11. Western Blotting**

1373 Os trofozoítos foram lisados utilizando um tampão de lise (20 mM de Tris-
1374 HCl, 2 mM de EDTA, 0,1% de SDS, 0,5% de deoxicolato, 1% de Tritron X-100,
1375 137 mM de NaCl e 10% de glicerol) suplementado com coquetel de inibidores de
1376 proteases. As células foram mantidas nesta solução por 30 min a -4 C°. O lisados
1377 celulares totais foram misturados com uma solução contendo Tris-HCl 62 mM,
1378 glicerol 7%, SDS 2,5%, mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,01% e fervidos
1379 durante 5 min. A dosagem de proteínas no homogeneizado total foi realizada de
1380 acordo com o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). A eletroforese foi realizada
1381 seguindo o procedimento descrito por Laemmli (1970). O homogeneizado total
1382 de *G. intestinalis* foi diluído em tampão de amostra (300 µL de tampão de
1383 amostra Laemmli - Bio-Rad Laboratories, USA, 15 µl de β-mercaptoetanol e
1384 coquetel de inibidores de protease 1x concentrado (Sigma, EUA) para uma
1385 concentração final de 30 µg/µL de proteínas. As proteínas foram separadas de
1386 acordo com o peso molecular em gel de poliacrilamida 12%, seguindo os
1387 seguintes parâmetros: 120V em 90 min. O peso molecular das proteínas foi
1388 comparado com o padrão kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, EUA). As
1389 preparações com 30 µg/µL de proteínas foram eletrotransferidas para
1390 membranas de PVDF (Millipore Corporation, USA) utilizando o aparelho de
1391 transferência (BioRad, EUA) semi-seco a 10V, por 90 min, como descrito por
1392 Towbin e colaboradores (1979). As membranas de Polyvinylidene fluoride
1393 (PVDF) com as proteínas eletrotransferidas foram lavadas 2x com tampão TBS-
1394 T (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de cloreto de sódio e 0,1% de Tween-20) pH 8.
1395 Em seguida, foram realizados bloqueios com leite desnatado (Molico, Brasil) a
1396 3% diluído em tampão TBS-T, por 1 h. As membranas de PVDF foram incubadas

1397 com os anticorpos primários monoclonais: *anti-H4K16ac* (*anti-acetyl-histone*
1398 *H4 Lys 16*) 1:1000 (*Thermo Fisher; EUA*), anti-tubulina acetilada 1:2000 (*Thermo*
1399 *Fisher; EUA*) e GAPDH 1:2500 (*Thermo Fisher; EUA*) por 3 h. A revelação foi feita
1400 com o kit de quimioluminescência ECL (*Amersham Biosciences, Suécia*), por 3
1401 min. Os resultados foram obtidos através do aparelho imageQuant LAS 500 –
1402 (*GE Healthcare, Suécia*). Os resultados foram analisados e quantificados usando
1403 o software *Image-J* (*National Institutes of Health, NIH*).

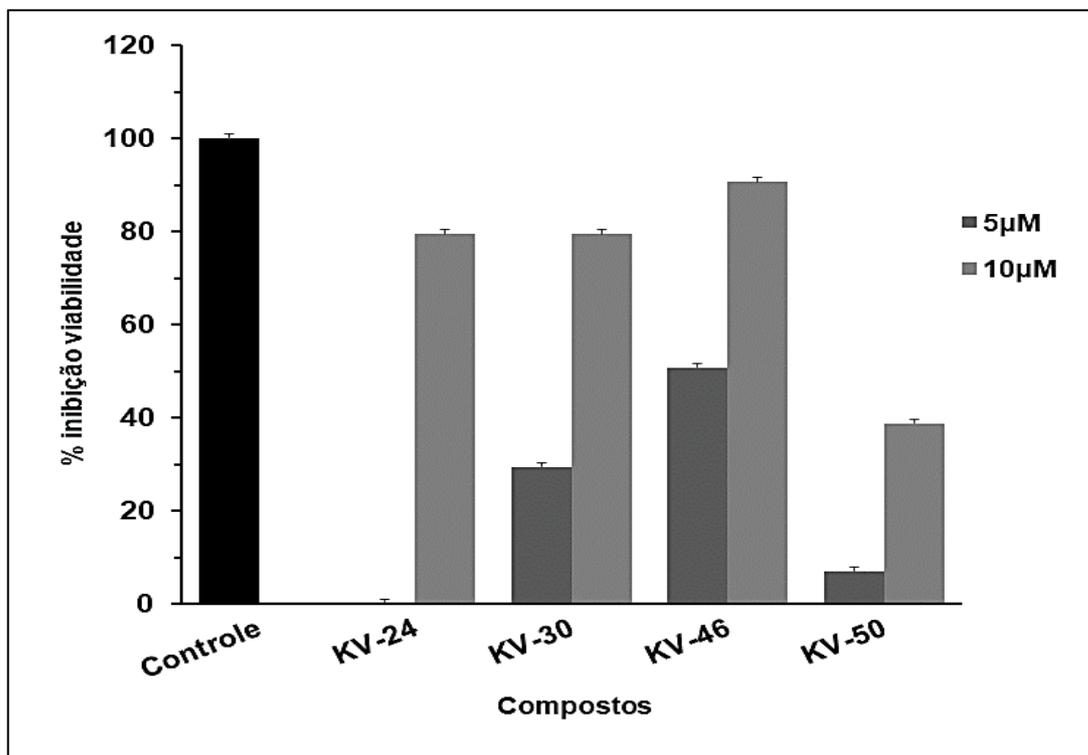
1404

1405 5. RESULTADOS

1406 5.1. Ensaio preliminar da viabilidade dos trofozoítos tratados com HDACi

1407 Trofozoítos de *G. intestinalis* foram incubados com os inibidores KV-24,
1408 KV-30, KV-46 e KV-50 na concentração de 5 μ M e 10 μ M por 48 h. O tempo e
1409 as concentrações foram selecionados com base em trabalhos anteriores do
1410 nosso grupo (CORRÊA E BENCHIMOL, 2006; GADELHA et al., 2019). A
1411 quantificação das células viáveis foi realizada usando o método colorimétrico
1412 com MTS/PMF. Esse ensaio inicial foi utilizado para avaliar quais compostos
1413 mais afetariam a viabilidade dos trofozoítos e o resultado utilizado como critério
1414 de seleção para definir os que continuariam a ser testados.

1415 Nos resultados mostrados na **figura 14** é possível observar que o
1416 composto KV-24 inibiu a viabilidade do parasita em 79,5% na concentração de
1417 10 μ M, contudo, não apresentou nenhum efeito quando administrado na
1418 concentração de 5 μ M. O composto KV-30 inibiu a viabilidade do parasita em
1419 29,45% na concentração de 5 μ M e 79,52% na de 10 μ M; já o composto KV-46
1420 inibiu a viabilidade do parasita na concentração de 5 μ M em 50,77% e 90,75%
1421 na concentração de 10 μ M. O KV-50 apresentou apenas 6,88% e 38,78% de
1422 inibição na viabilidade do parasita nas concentrações de 5 e 10 μ M,
1423 respectivamente. Desta forma, pelo fato dos compostos KV-30 e KV-46 terem
1424 demonstrado maior eficiência nas duas concentrações utilizadas como teste (5
1425 μ M e 10 μ M), eles foram selecionados para uso nos experimentos posteriores.



1426

1427 **Figura 14.** Inibição da viabilidade celular em 48 h de cultivo. Os parasitas foram
 1428 cultivados na ausência (preto) ou na presença dos compostos KV-24, KV-30,
 1429 KV-46 e KV-50 nas concentrações de 5 μM (cinza escuro) e 10 μM (cinza claro).
 1430 Nota-se que os compostos que apresentaram o maior índice de inibição da
 1431 viabilidade do parasita, nas duas concentrações, foram os compostos KV-30 e
 1432 KV-46. O controle foi considerado como 100% (n=2).

1433 5.2. Curvas de crescimento

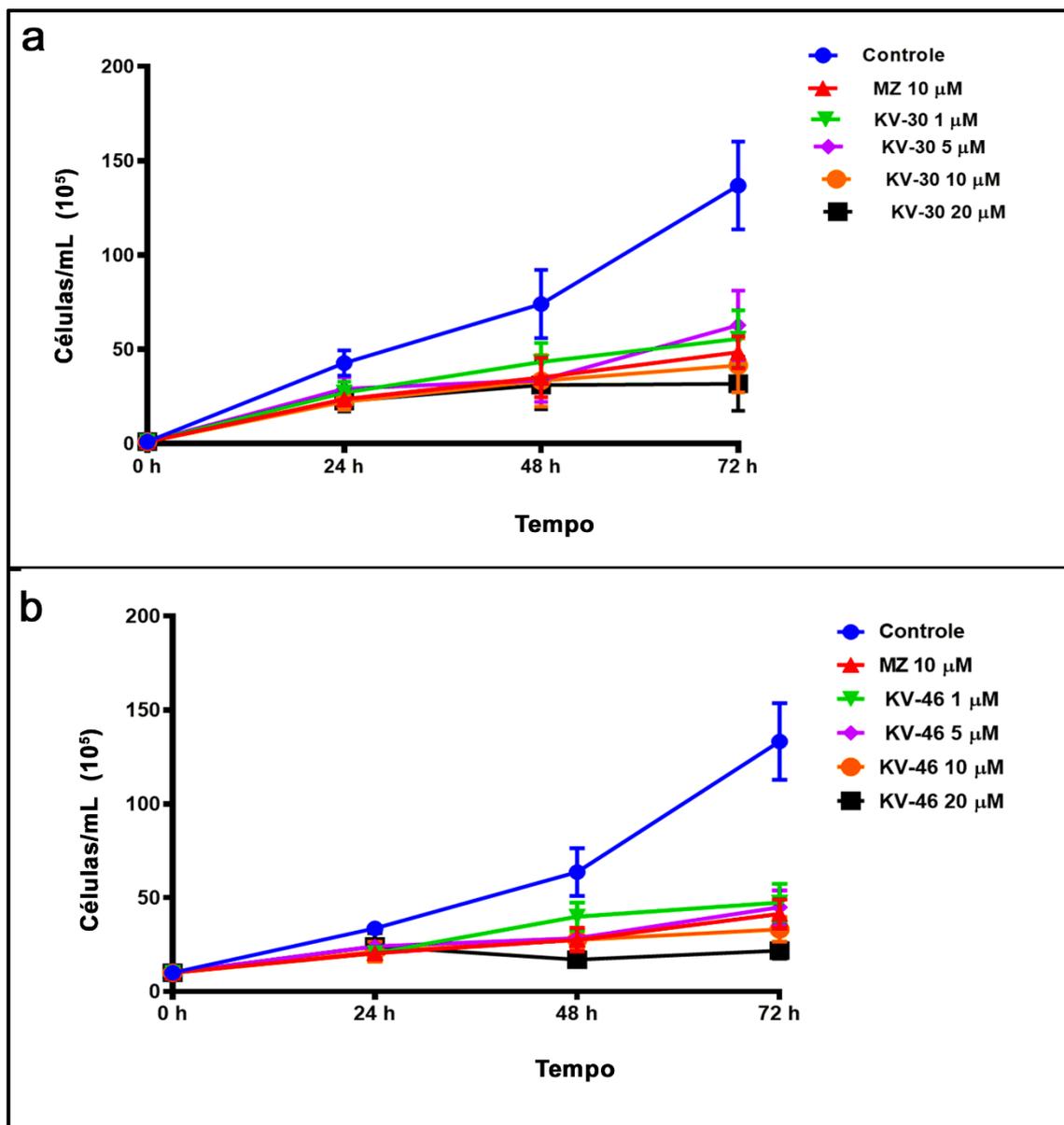
1434 As **figuras 15a e 15b** indicam a curva de crescimento das culturas
 1435 tratadas com os compostos KV-30 (**Figura 15a**) e KV-46 (**Figura 15b**). Os
 1436 ensaios foram realizados nas concentrações de 1 μM, 5 μM, 10 μM e 20 μM e
 1437 nos tempos de 24, 48 e 72 h. Essas concentrações foram adotadas considerando
 1438 ensaios anteriores com outros compostos testados pelo nosso grupo (CORRÊA
 1439 e BENCHIMOL, 2006; GADELHA et al., 2019).

1440 Os resultados indicaram que após 24 h de tratamento, ocorreu a
 1441 diminuição na proliferação celular das culturas expostas aos compostos KV-30
 1442 (**Figura 15a**) e KV-46 (**Figura 15b**), no entanto, esta redução não foi
 1443 estatisticamente significativa ($p > 0.05$). Em 48 h, foi observado que a quantidade
 1444 de trofozoítos na cultura controle aumentou como o esperado, e assim, permitiu

1445 evidenciar a diminuição da multiplicação celular das culturas tratadas com os
1446 compostos KV-30 (**Figura 15a**) e KV-46 (**Figura 15b**). Foi observada
1447 significância estatística na diminuição das culturas tratadas com a concentração
1448 de 1 μM ($p < 0.001$) para ambos os compostos e importante significância
1449 estatística ($p < 0.0001$) para as tratadas nas concentrações de 5, 10 e 20 μM para
1450 os dois compostos em 48 h de tratamento. Por fim, ao avaliar o tempo de 72 h,
1451 foi perceptível que as culturas tratadas com os inibidores KV-30 (**Figura 15a**) e
1452 KV-46 (**Figura 15b**) apresentaram uma redução em sua proliferação quando
1453 comparadas com as culturas controles, apresentando importante significância
1454 estatística na diminuição da multiplicação do parasita ($p < 0.0001$) em todas as
1455 concentrações testadas. Os valores de IC_{50} para cada composto foram
1456 determinados nos tempos de 48 e 72 h (**Quadro 4**). Os compostos KV-30 e KV-
1457 46 apresentaram, respectivamente, um valor de IC_{50} no tempo de 48 h de 3,7
1458 μM e 3,4 μM , e no tempo de 72 h de 0,332 μM e 0,179 μM (**Quadro 4**).

1459 A **figura 16** demonstra os ensaios realizados com o DMSO, veículo de
1460 diluição dos compostos, indicando que não houve alteração na proliferação do
1461 parasita em nenhuma das concentrações utilizadas ($p > 0.05$), sugerindo assim,
1462 que o efeito inibitório na proliferação observado nas curvas anteriores (**Figura**
1463 **15a-b**) é proveniente da ação dos compostos, ou seja, todas as alterações que
1464 ocorreram na curva de crescimento das culturas de *G. intestinalis* tratadas com
1465 KV-46 e KV-30 não tiveram influência do diluente (DMSO).

1466 Em virtude do composto KV-46 ter apresentado um efeito maior em todos
1467 os tempos e o menor valor de IC_{50} (**Quadro 4**), os ensaios posteriores (descritos
1468 abaixo) foram realizados avaliando somente a ação deste composto nos
1469 trofozoítos de *G. intestinalis*.



1470

1471 **Figura 15.** Curva de crescimento dos trofozoítos em 24, 48 e 72 h, cultivados na
 1472 ausência (controle) ou na presença dos inibidores de histonas desacetilases. **a.**

1473 Curva de crescimento na presença do composto KV-30 nas concentrações de 1

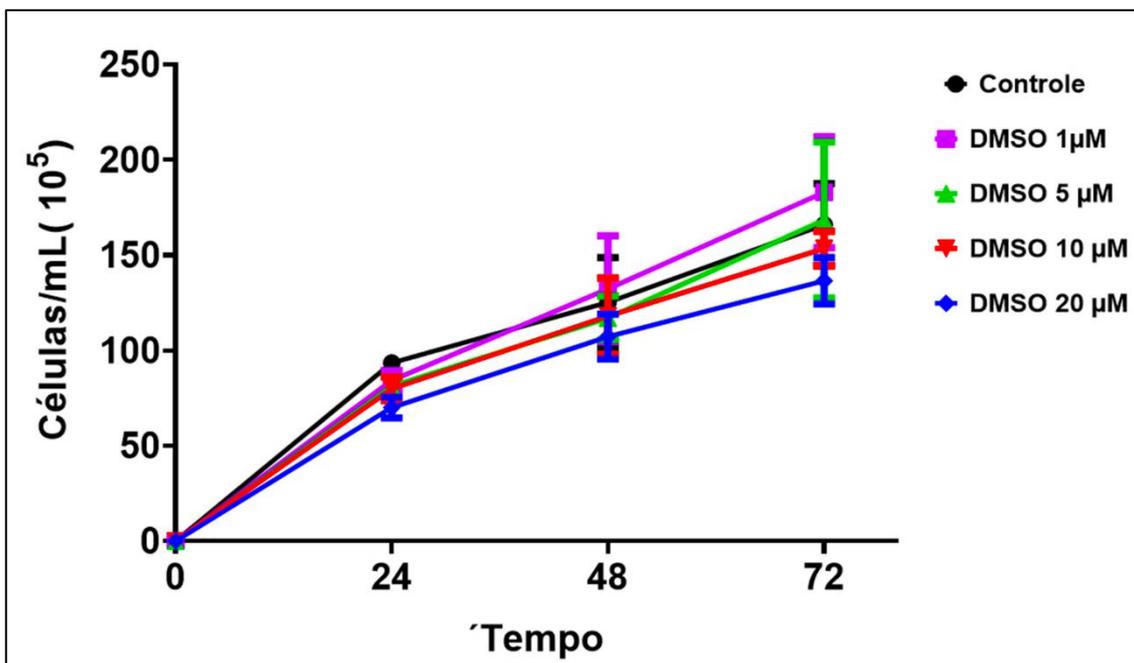
1474 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. **b.** Curva de crescimento na presença do composto

1475 KV-46 nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. O metronidazol na
 1476 concentração de 10 μ M foi utilizado como droga de escolha para comparação.

1477 Nota-se que os compostos KV-30 e KV-46 diminuíram a proliferação dos
 1478 trofozoítos de *G. intestinalis* a partir do tempo de 48 h de tratamento. O número

1479 de parasitas foi determinado usando o microscópio óptico e um hemocitômetro.

1480 Os resultados são expressos como média \pm SEM (n = 4).



1481

1482 **Figura 16.** Curva de crescimento dos trofozoítos em 24, 48 e 72 h, cultivados na
 1483 ausência (controle) ou na presença do DMSO nas concentrações de 0,01 %,
 1484 0,05 %, 0,1% e 0,2%. Não houve redução na proliferação do parasita após o uso
 1485 do solvente em nenhuma concentração utilizada ($p > 0.05$). O número dos
 1486 parasitas foi determinado usando o microscópio óptico e um hemocítômetro. Os
 1487 resultados são expressos como a média \pm SEM ($n = 4$).

1488 **Quadro 4.** Valores de IC_{50} obtidos para os compostos KV-30 e KV-46 em *G.*
 1489 *intestinalis*.

Valores da IC_{50}			
KV-30		KV-46	
Tempo	Concentração	Tempo	Concentração
48 h	3,7 μ M	48 h	3,4 μ M
72 h	0,3 μ M (332 nm)	72 h	0,1 μ M (179 nm)

1490

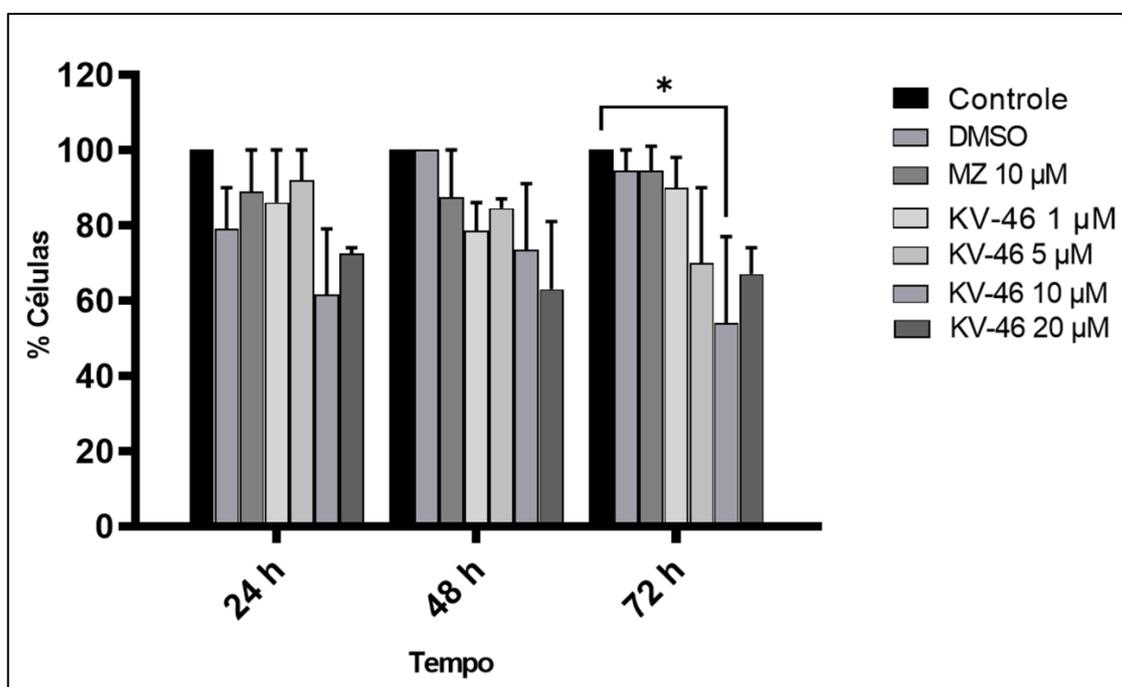
1491 Os valores de IC_{50} foram calculados no programa GraphPad Prism 7.00 com os
 1492 dados obtidos com as curvas de crescimento.

1493 5.3. Viabilidade celular

1494 5.3.1. Viabilidade do trofozoítio por MTS/PMS

1495 O ensaio foi realizado somente com o composto KV-46 (**Figura 17**) nas
 1496 concentrações de 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM nos tempos de 24, 48 e 72h. O
 1497 Metronidazol (10 μM) foi utilizado como droga de escolha para comparação. O
 1498 DMSO (20 μM) e o formaldeído 4% foram utilizados como controles negativo e
 1499 positivo, respectivamente, nos mesmos tempos.

1500 Como podemos observar na **figura 17** as culturas tratadas com o inibidor
 1501 KV-46 (**Figura 17**) apresentou nas primeiras 24 h uma redução na viabilidade do
 1502 parasita, principalmente nas concentrações de 10 μM e 20 μM , porém sem
 1503 significância estatística ($p > 0.05$). Como é possível observar na **figura 17**, após
 1504 48 h de tratamento essa discreta redução se manteve nas concentrações. Uma
 1505 diminuição da viabilidade das culturas tratadas com o composto KV-46 foi
 1506 observada a partir da concentração de 10 μM em 72 h de tratamento quando
 1507 comparado com o controle. O metronidazol, a droga padrão de escolha para o
 1508 tratamento, não reduziu a viabilidade celular.



1509

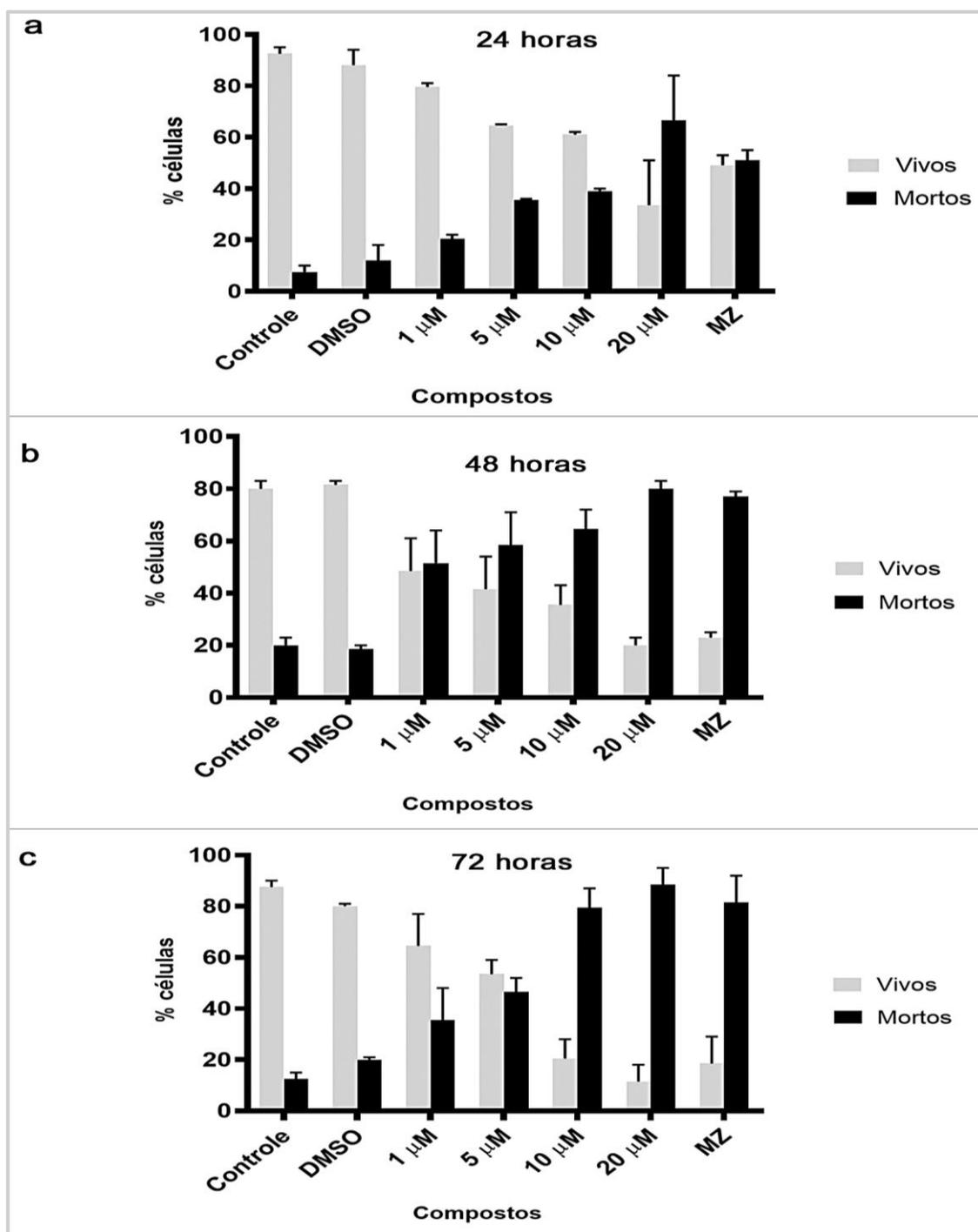
1510 **Figura 17:** Viabilidade dos trofozoítos após 24, 48 e 72 h. Os parasitas foram
 1511 cultivados na ausência (controle) ou na presença do composto KV-46 nas

1512 concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M. DMSO na concentração de 0,1%
1513 e formaldeído 4% foram utilizados como controle negativo e positivo,
1514 respectivamente. O metronidazol foi utilizado como droga de referência para
1515 comparação. Note que a redução na viabilidade do parasita ocorre nas maiores
1516 concentrações de KV-46 em 72 h de tratamento. Os resultados são expressos
1517 como média \pm SEM. Os controles foram considerados como 100% (n = 3).

1518 **5.3.2. Viabilidade celular por diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio**

1519 O ensaio de viabilidade celular dos trofozoítos de *G. intestinalis* foi
1520 realizado usando dois marcadores: o diacetato de fluoresceína (DAF) que reage
1521 com o óxido nítrico (NO) e forma um benzotriazol fluorescente. Essa
1522 fluorescência (verde) é um indicador de células viáveis, pois esse reagente só
1523 tem a capacidade de permear a membrana plasmática das células que estão
1524 vivas. Já o iodeto de propídeo (PI), possui alta afinidade pelo DNA, mas só
1525 consegue permear a membrana de células inviáveis, se tornando assim um o
1526 indicador de célula mortas ou com a viabilidade comprometida. O IP age se
1527 ligando aos ácidos nucléicos e fluorescendo os núcleos em vermelho das células
1528 mortas ou inviáveis. Esta análise foi realizada em células do grupo controle e
1529 aquelas incubadas com as concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M do
1530 composto KV-46. Em 24 h de cultivo, 91,8% da cultura controle estavam coradas
1531 somente pelo diacetato de fluoresceína e 8,1% com o iodeto de propídeo (**Figura**
1532 **18a**). No mesmo período, as culturas tratadas com 1, 5 e 10 μ M de KV-46
1533 apresentaram uma porcentagem de células viáveis de 77,3%, 55,2% e 60%,
1534 respectivamente. Nas culturas tratadas com 20 μ M a porcentagem de células
1535 viáveis foi de 35,5% após 24 h (**Figura 18a**). A porcentagem de células viáveis
1536 diminuiu após 48 h de tratamento. As concentrações de 1, 5, 10 e 20 μ M
1537 apresentaram, respectivamente, 50%, 42%, 36%, 25% de células viáveis,
1538 enquanto o controle tinha 80% (**Figura 18b**). Depois de 72 h de crescimento da
1539 cultura, 86,9% dos parasitas não tratados estavam viáveis, conforme
1540 determinado usando o diacetato de fluoresceína (**Figura 18c**). A porcentagem
1541 de células viáveis nas culturas tratadas nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M
1542 e 20 μ M foi, respectivamente, 61,3%, 58,3%, 26,1% e 14% indicando um efeito
1543 dose dependente (**Figura 18c**). Apesar da diminuição na porcentagem de

1544 células viáveis ter sido observada em todas as concentrações do composto, esta
 1545 redução foi estatisticamente significativa a partir da concentração de 10 μM
 1546 ($p < 0.001$). A porcentagem de células viáveis após administração do
 1547 metronidazol se manteve em torno de 30% durante os três tempos analisados.



1548

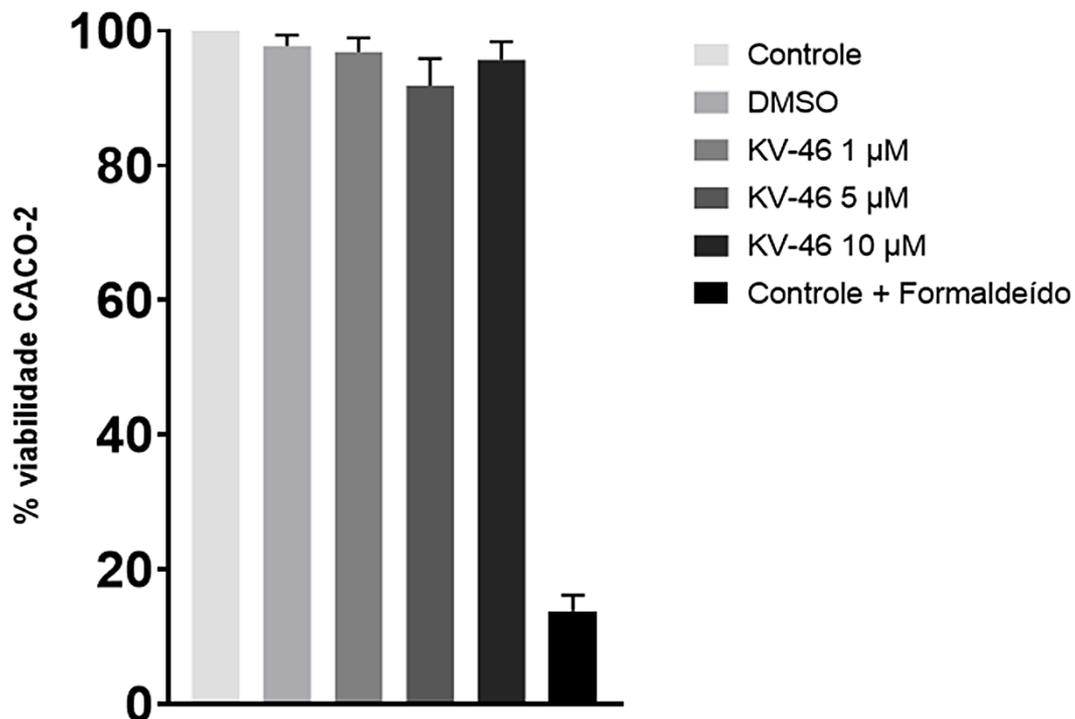
1549 **Figura 18.** Gráfico da viabilidade de trofozoítos *G. intestinalis* em 24, 48 e
 1550 72 h, cultivados na ausência (controle) ou na presença do inibidor de histonas

1551 desacetilases KV-46. **(a)**. Viabilidade do parasita na presença do composto KV-
1552 46 nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M por 24 h. **(b)**. Viabilidade
1553 do parasita na presença do composto KV-46 nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M,
1554 10 μ M e 20 μ M por 48 h. **(c)**. Viabilidade do parasita na presença do composto
1555 KV-46 nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M por 72 h. O
1556 metronidazol na concentração de 10 μ M foi utilizado como droga de escolha para
1557 comparação. Nota-se que o composto KV-46 diminuiu a viabilidade dos
1558 trofozoítos de *G. intestinalis* a partir do tempo de 24 h de tratamento. A
1559 porcentagem de trofozoítos viáveis e não-viáveis foi determinado pela contagem
1560 de células coradas em verde (diacetato de fluoresceína) e vermelho (iodeto de
1561 propídeo) de um total de 100 células, usando o microscópio de fluorescência *Axio*
1562 *Observer.Z1* (Zeiss, Jena, Germany). Os dados foram calculados no programa
1563 *GraphPad Prism 7.00* e os resultados são expressos como média \pm SEM (n =2).

1564 **5.4. Ensaio de citotoxicidade em células de mamífero**

1565 Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para avaliar o efeito do
1566 composto KV-46 em células epiteliais intestinais humanas (CACO-2). Nesse
1567 contexto, a viabilidade das células nas culturas controle e tratadas foi avaliada
1568 após 48 h de tratamento utilizando o ensaio colorimétrico de redução do sal de
1569 tetrazólio MTS/PMS.

1570 Como pode ser observado na **figura 19**, o tratamento com as diferentes
1571 concentrações de KV-46 por 48 h, não interferiu na viabilidade das células
1572 intestinais humanas ($p>0.05$). Nesses ensaios, o formaldeído a 4% foi utilizado
1573 como controle positivo de inviabilidade celular. É importante ressaltar que as
1574 concentrações administradas nas células intestinais foram vinte vezes maiores
1575 que a concentração de IC₅₀ obtida nos ensaios de curva de crescimento dos
1576 trofozoítos no tempo de 48 h (3,4 μ M). Contudo, como podemos observar no
1577 ensaio com MTS/PMS realizados nos parasitas, o composto KV-46 afetou a
1578 viabilidade de *G. intestinalis* (**Figura 17**) quando comparado com as células
1579 cacos, sugerindo assim que o composto KV-46 afete mais a viabilidade dos
1580 parasitas do que a viabilidade das células de mamíferos.



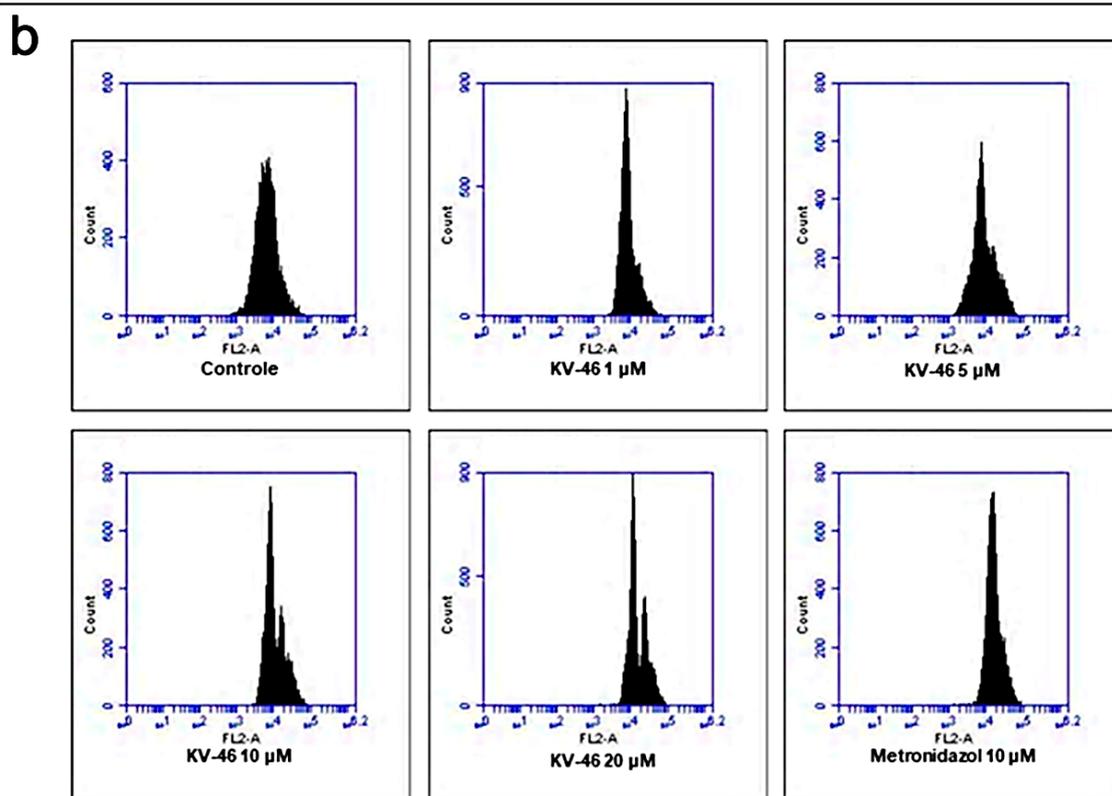
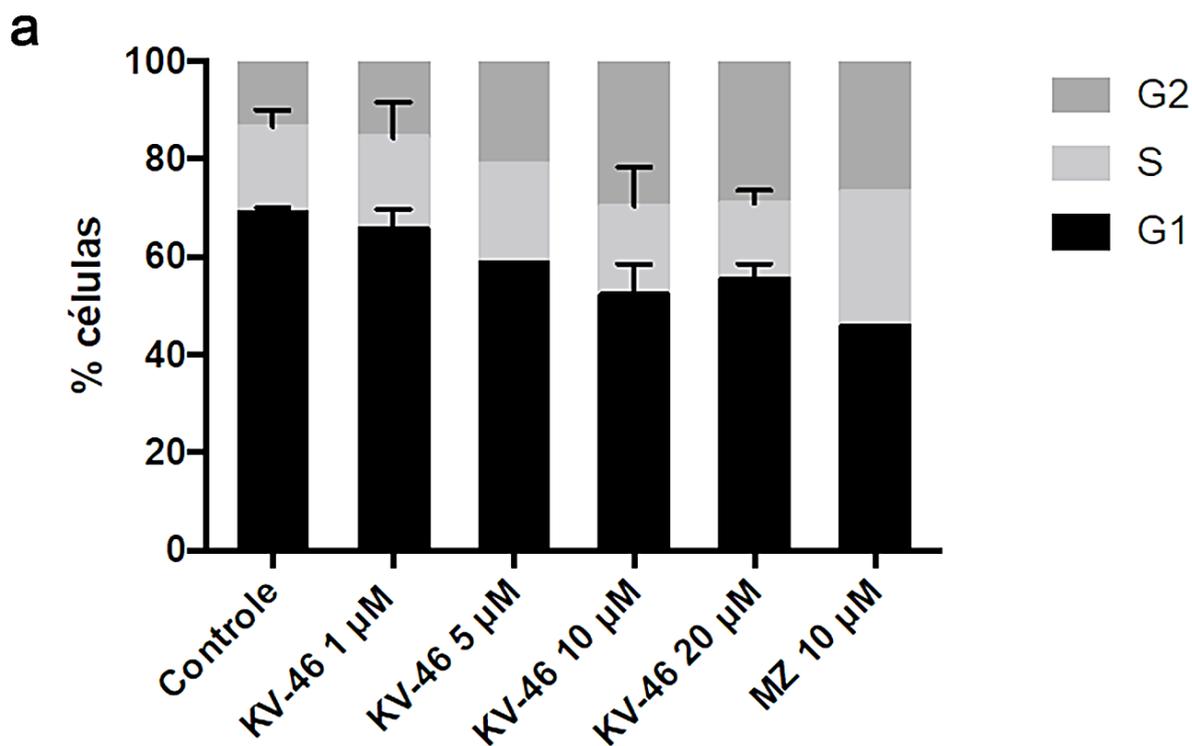
1581

1582 **Figura 19. Gráfico indicando a viabilidade das células epiteliais intestinais**
 1583 CACO-2 quando tratadas com o composto KV-46 nas concentrações de 1, 5 e
 1584 10 µM por 72 h. Nota-se que o composto KV-46 não alterou a viabilidade do
 1585 parasita em nenhuma das concentrações testadas ($p>0.05$). Os dados foram
 1586 calculados no programa *GraphPad Prism 7.00* e os resultados são expressos
 1587 como média \pm SEM (n =5).

1588 5.5. Ciclo celular

1589 Os dados obtidos nos ensaios de curva de crescimento mostraram a
 1590 redução na proliferação do parasita, o que poderia indicar o bloqueio do ciclo
 1591 celular pelo composto KV-46. Para avaliar se esse efeito estaria realmente
 1592 ocorrendo, os trofozoítos foram expostos a 1 µM, 5 µM, 10 µM e 20 µM da droga
 1593 durante 24 h e, subsequentemente, o ciclo celular foi analisado por citometria de
 1594 fluxo seguindo protocolos já publicados (CORRÊA et al., 2009; UZLIKOVA e
 1595 NOHYNKOVA, 2014; GADELHA et al., 2019). Os resultados mostraram que a
 1596 cultura controle exibia 69% de células na fase G1, 17,5% de células na fase S e
 1597 14,2% de células na fase G2/M (**Figura 20a-b**). Como pode ser observado na
 1598 **figura 20b**, após a administração do composto KV-46 houve uma diminuição de

1599 células na fase G1 e um aumento na fase G2/M. Em 24 h, os parasitas tratados
1600 com 1 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM exibiram uma porcentagem de células na fase
1601 G1 de 65,6%, 58,5%, 52,1% e 55,2%, respectivamente (**Figura 20a-b**). A
1602 porcentagem de células na fase G2/M aumentou para 17,2%, 22,5%, 30,6% e
1603 31,9% após o tratamento com 1 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM , respectivamente
1604 (**Figura 20a-b**). Os dados indicam que o aumento no número de parasitas na
1605 fase G2/M foi dose-dependente, parecendo estabilizar entre as concentrações
1606 de 10 μM e 20 μM (**Figura 20a-b**). O metronidazol, utilizado como droga para
1607 comparação, induziu um acúmulo de células, principalmente, na fase S,
1608 condizente ao descrito na literatura (SANDHU et al., 2004; UZLIKOVA e
1609 NOHYNKOVA, 2014).



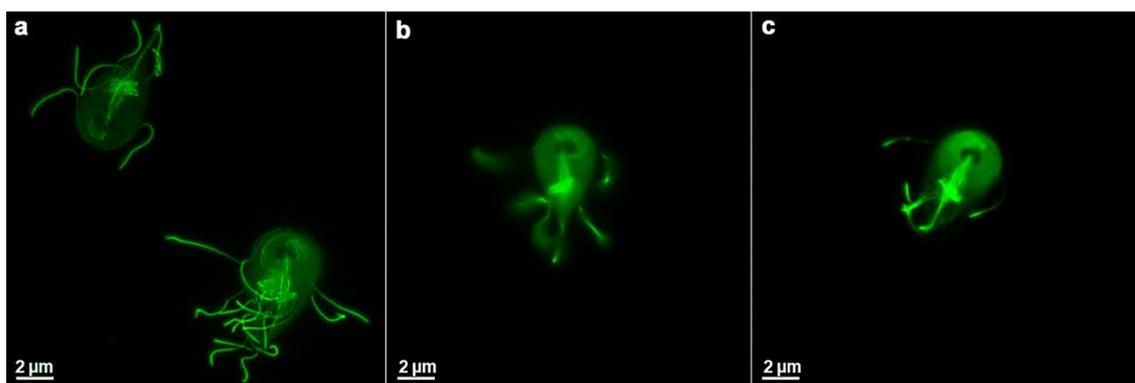
1610

1611 **Figura 20. Análise do ciclo celular de trofozoítos de *G. intestinalis* por**
 1612 **citometria de fluxo. (a) Trofozoítos controle e tratados com diferentes**
 1613 **concentrações (1 µM, 5 µM, 10 µM e 20 µM) de KV-46 por 24 h. A porcentagem**

1614 de células nas fases G1, S e G2/M é observada para cada condição. O
1615 metronidazol na concentração de 10 μM foi utilizado como droga de escolha para
1616 comparação. **(b)** Histogramas representativos do ciclo celular em culturas
1617 controle e tratadas com 1 μM , 5 μM , 10 μM e 20 μM de KV-46 e com o
1618 metronidazol (10 μM) por 24 h

1619 5.6. Imunofluorescência

1620 Para determinar se o composto KV-46 alterava os componentes do
1621 citoesqueleto dos trofozoítos, ensaios de imunofluorescências foram realizados.
1622 Para isto, foi utilizado o anticorpo anti-tubulina acetilada para marcação das
1623 estruturas microtubulares presentes no parasita. Na **figura 21a**, são observadas
1624 células controle após 48 h de crescimento. A marcação com o anticorpo anti-
1625 tubulina acetilada foi observada nos flagelos, no disco ventral e no corpo
1626 mediano (**Figura 21a**). Após tratamento com KV-46 (**Figura 21b-c**), nenhuma
1627 alteração no padrão de marcação da tubulina acetilada foi observada
1628 independente da concentração analisada (**Figura 21b-c**) quando comparados
1629 com o controle (**Figura 21a**). Contudo, quando comparado ao controle, foram
1630 notados aglomerados contendo células multinucleadas e multiflageladas após a
1631 administração do composto KV-46 (dados não mostrados).



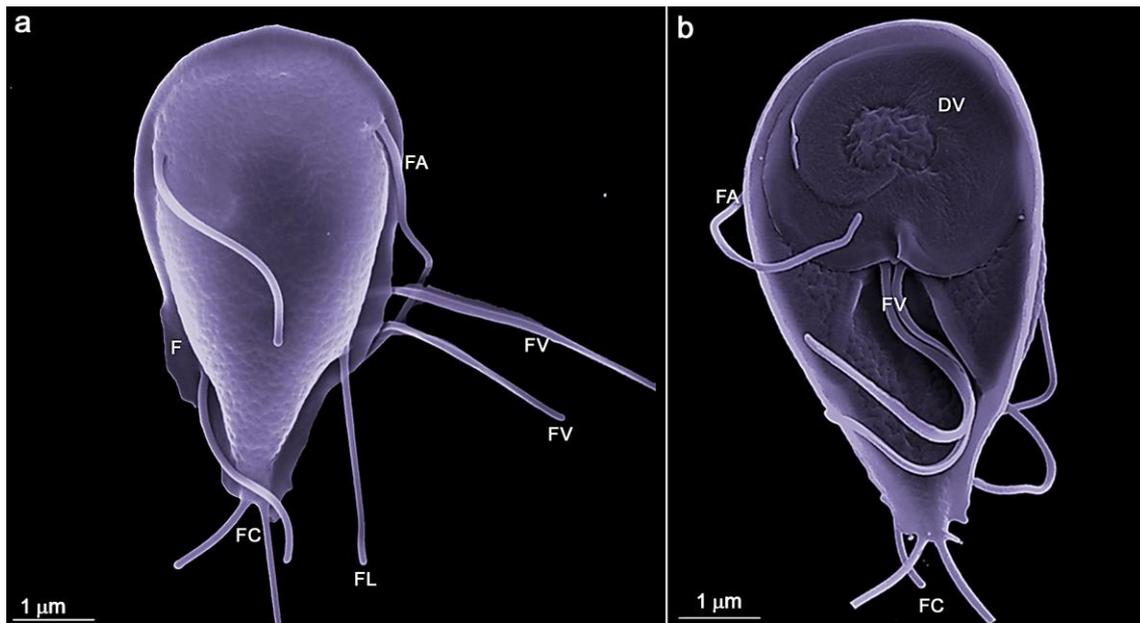
1632

1633 **Figura 21.** Imunofluorescência de *G. intestinalis* usando anticorpo anti-tubulina
1634 acetilada. **(a)** Trofozoítos controle exibem marcação para tubulina acetilada nos
1635 flagelos, no disco ventral e no corpo mediano; **(b-c)** Trofozoítos tratados com o
1636 composto KV-46 nas concentrações de 1 μM **(b)** e 5 μM **(c)** apresentam o mesmo
1637 padrão de marcação comparado ao controle.

1638 **5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

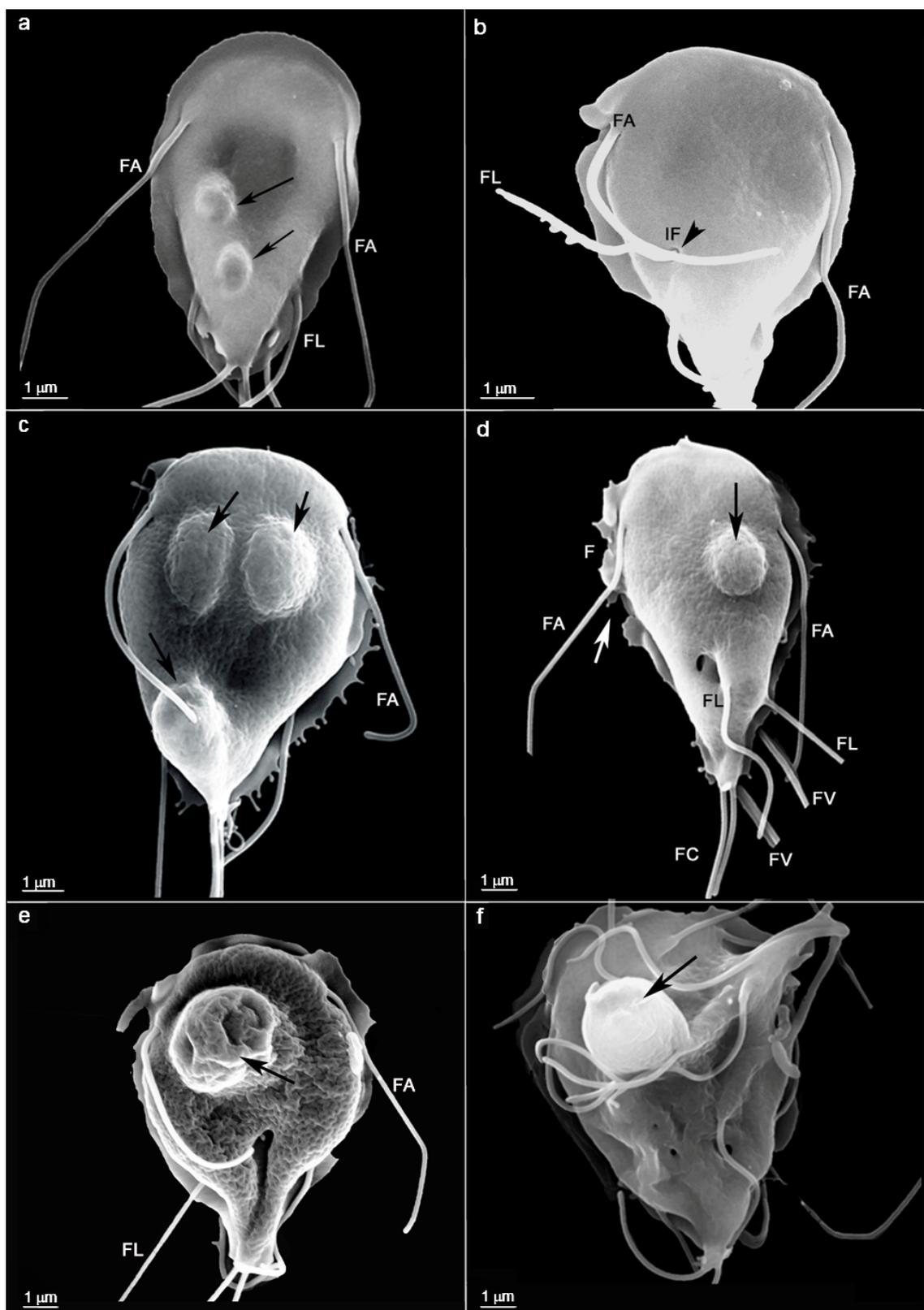
1639 A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar possíveis
1640 alterações na superfície do parasita após os tratamentos. Para esses ensaios,
1641 foram analisadas culturas tratadas com 1 μM , 5 μM e 10 μM de KV-46, após 48
1642 h.

1643 O trofozoíto da cultura controle, sem nenhum tratamento, apresentou o
1644 formato típico piriforme, com os quatro pares de flagelos, a membrana
1645 plasmática íntegra, o disco ventral e a flange ventro-lateral íntegros (**Figura 22a-**
1646 **b**). Os trofozoítos expostos ao KV-46 na concentração de 1 μM apresentaram
1647 protusões na sua superfície dorsal (**Figura 23a**). A partir da incubação dos
1648 trofozoítos com a concentração de 5 μM percebemos o início da internalização
1649 de alguns flagelos (**Figura 23b**). Protrusões de superfície em locais próximos à
1650 região correspondente ao núcleo do parasita (**Figura 23c**) e irregularidades na
1651 morfologia da flange ventro-lateral (**Figura 23d**) também foram observadas após
1652 o tratamento. Apesar dessas alterações, a forma geral do parasito se manteve
1653 preservada após a administração das concentrações mais baixas do composto
1654 KV-46 (**Figura 23a-b**). As modificações na morfologia celular foram mais
1655 intensas e evidentes conforme o aumento da concentração da droga (**Figura**
1656 **23e-f**). Dessa forma, observamos que após a incubação com 10 μM , essas
1657 protusões estavam presentes em 74% da população (N=400 células). Além
1658 disso, foi possível notar que nessa concentração houve ainda uma leve alteração
1659 no formato do trofozoíto (**Figura 23e-f**). As células em divisão, indicadas pelo
1660 aumento do número de flagelos, apresentavam-se disformes e com alterações
1661 na superfície (**Figura 23f**).



1662

1663 **Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do trofozoíto controle de *G.***
 1664 ***intestinalis*. (a)** A superfície dorsal do trofozoíto é observada; note que o aspecto
 1665 piriforme da célula, bem como a superfície, flange ventro-lateral e os quatro
 1666 pares de flagelos estão íntegros. **(b)** O trofozoíto em posição ventral. Nota-se a
 1667 forma espiral do disco ventral, os flagelos anteriores, os ventrais e os caudais.
 1668 Barras: 1 µm. **DV** - Disco ventral; **F** – Flange; **FA, FL, FV, FC** – Flagelos: Flagelo
 1669 Anterior (**FA**); Flagelo Lateral (**FL**); Flagelo Ventral (**FV**); Flagelo Caudal (**FC**).
 1670 Imagens colorizadas e tratadas com o programa *Photoshop*.



1671

1672 **Figura 23. Trofozoítos expostos ao composto KV-46 na concentração de 1**
 1673 **μM , 5 μM e 10 μM por 48 h e observados por microscopia eletrônica de**
 1674 **varredura. (a) Notam-se protusões na superfície dorsal do parasita a partir da**

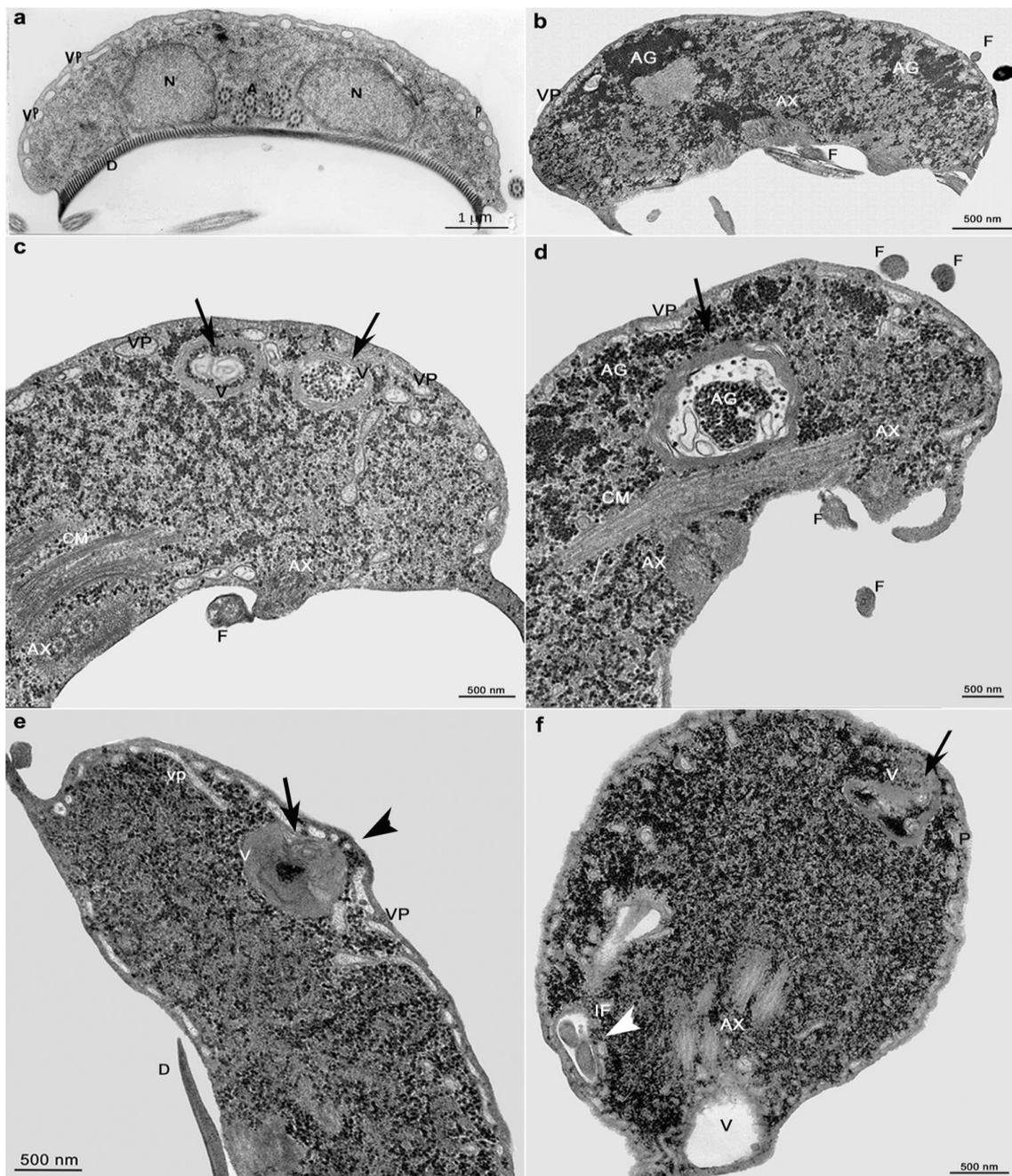
1675 concentração do composto a 1 μM . **(b)** Observa-se o início da internalização do
1676 flagelo póstero-lateral na concentração de 5 μM . **(c)** Protrusões associadas a
1677 região correspondente aos núcleos após o tratamento com 10 μM , **(d)** A
1678 descontinuidade da flange ventro-lateral e o processo de internalização do
1679 flagelo póstero-lateral são observados. **(e)** Percebe-se ainda uma leve alteração
1680 no formato piriforme do trofozoíto. **(f)** Célula em divisão indicada pelo aumento
1681 do número de flagelos apresentando modificação de sua forma e alterações na
1682 superfície dorsal. Setas pretas, protrusões de membranas; seta branca
1683 irregularidade no flange; cabeça de seta, local da internalização dos flagelos.
1684 Barras: 1 μm . **DV** - Disco ventral; **F**- Flange ventro-lateral; **FA, FL, FV, FC** –
1685 Flagelos: Flagelo Anterior (**FA**); Flagelo Ventral (**FV**); Flagelo póstero-lateral
1686 (**FL**); Flagelo Caudal (**FC**); internalização dos flagelos (**IF**). Imagens tratadas com
1687 o programa *Photoshop*.

1688 **5.8. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

1689 Utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão (MET) com o objetivo
1690 de verificar as possíveis alterações em organelas e estruturas do parasito após
1691 o tratamento. Assim como nos ensaios por MEV, foram analisadas as culturas
1692 incubadas com as concentrações de 1 μM , 5 μM e 10 μM do composto KV-46 por
1693 48 h.

1694 Nas imagens do parasito controle, sem nenhum tratamento, observamos
1695 os núcleos, axonemas, vesículas periféricas e o disco ventral sem nenhuma
1696 alteração estrutural, além dos grânulos de glicogênio distribuídos de forma
1697 homogênea por todo o citosol (**Figura 24a**). No entanto, no tratamento com 1 μM
1698 de KV-46 ocorreu a agregação de grânulos de glicogênio em locais distintos no
1699 citoplasma (**Figura 24b**). Outra alteração observada foi a presença de vacúolos
1700 com figuras mielínicas e grânulos de glicogênio em seu interior, indicativo de
1701 autofagia (**Figura 24c-d**). A frequência desses vacúolos se intensificou a partir
1702 do tratamento com 5 μM da droga (**Figura 24d**). Quando próximas à membrana
1703 plasmática, essas estruturas (vacúolos e figuras mielínicas) pareceram indicar
1704 uma deformação da superfície celular, originando uma elevação na região
1705 correspondente (**Figura 24e**). Corroborando os resultados obtidos por

1706 microscopia eletrônica de varredura, alguns flagelos foram vistos em vacúolos
 1707 sugerindo um processo de internalização (**Figura 24f**), de modo similar ao que
 1708 ocorre no processo de encistamento. Importante mencionar que danos nas
 1709 estruturas microtubulares do parasita não foram observados nos perfis de
 1710 células analisados ou nos núcleos (dados não mostrados).



1711

1712 **Figura 24. *G. intestinalis* controle (a) ou expostas ao composto KV-46 na**
 1713 **concentração de 1 µM, 5 µM e 10 µM por 48 h (b-f) e observadas por microscopia**

1714 eletrônica de transmissão. **(a)** Nota-se o aspecto homogêneo do citoplasma nas
1715 células controle. **(b)** A partir da administração de 1 μM do composto, observa-se
1716 o acúmulo de grânulos de glicogênio no citosol. **(c-d)** Vacúolos com figuras
1717 mielínicas (setas) e grânulos de glicogênio em seu interior são observados mais
1718 intensamente a partir do tratamento com 5 μM . **(e)** Os vacúolos (seta) e figuras
1719 mielínicas causam uma elevação na superfície do parasita (cabeça de seta) após
1720 o tratamento com 10 μM . **(f)** Observe os flagelos dentro de vacúolos (cabeça de
1721 seta branca) sugerindo que um processo de internalização ocorra após o
1722 tratamento. Barras: 500 nm. **AX-** Axonemas; **CM-** Corpo Mediano; **D** - Disco
1723 ventral; **F-** Flagelos. **IF** – Internalização de flagelos; **N-** Núcleos; **V-** Vacúolos;
1724 **VP-** Vesículas periféricas. Imagens tratadas com o programa *Photoshop*.

1725 **5.9. Western Blotting**

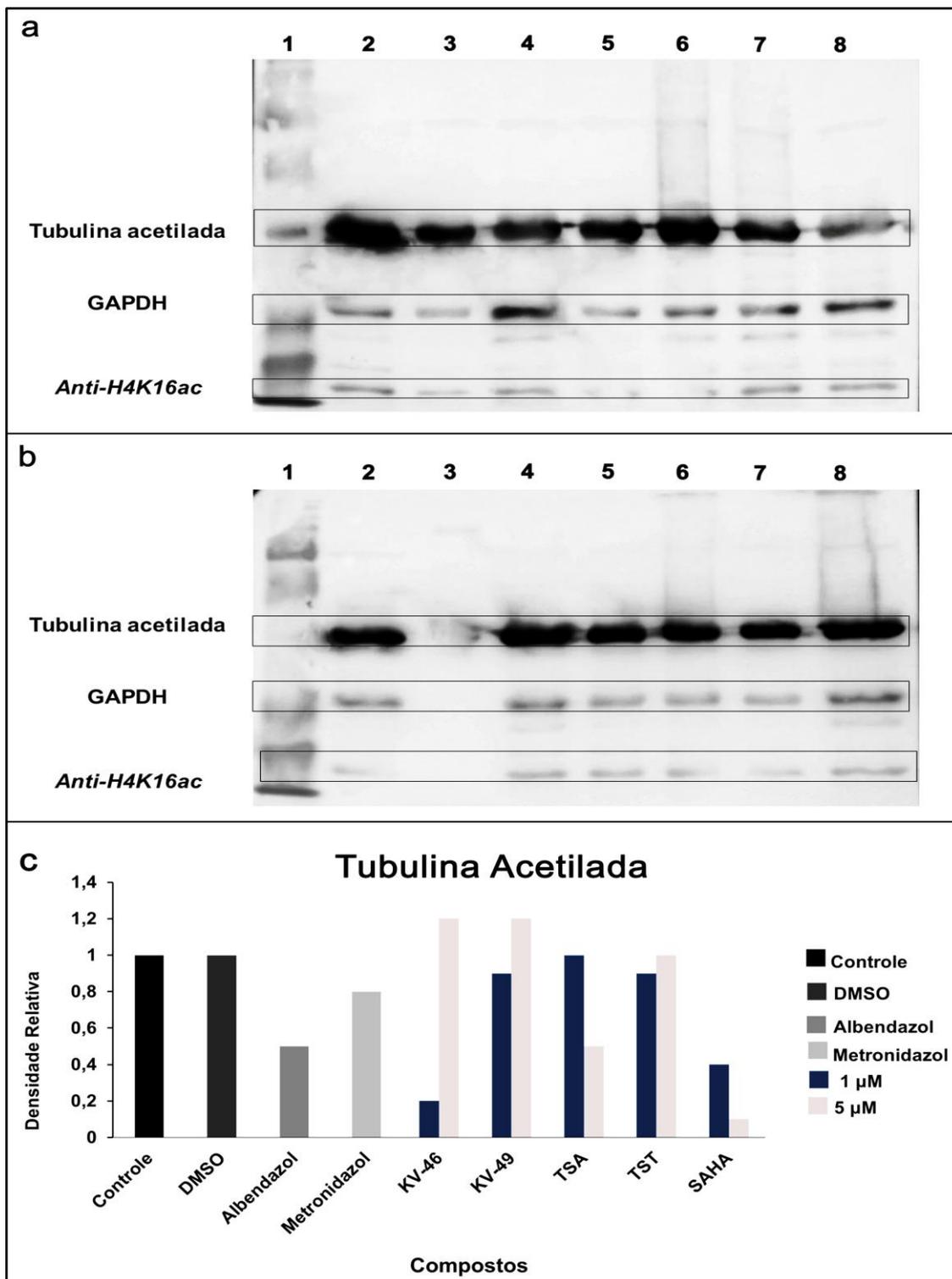
1726 Para investigar se o composto KV-46 poderia induzir remodelamento do
1727 citoesqueleto do parasita por possíveis alterações na acetilação de tubulina, a
1728 técnica de *Western Blotting* foi realizada usando anticorpo anti-tubulina
1729 acetilada. Para avaliar se houve alteração na atividade de acetilação foi utilizado
1730 também o anticorpo anti-lisina-*H4K16ac*. A enzima gliceraldeído 3-fosfato
1731 desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle, pois é considerada
1732 constante e é mais expressa durante os processos de encistamento (Yang et al.,
1733 2002).

1734 O controle foi realizado utilizando trofozoítos sem nenhum tipo de
1735 tratamento (**Figura 25a-2**) e com o DMSO (**Figura 25b-2**) como controle
1736 negativo por ser o veículo de diluição dos compostos. O albendazol (**Figura 25a-**
1737 **3**) foi utilizado como controle positivo, uma vez que essa droga é capaz de
1738 modular dímeros de tubulina em *G. intestinalis* (UPCROFT et., al 1996). O
1739 metronidazol foi utilizado por ser a droga de escolha para o tratamento da
1740 giardíase (**Figura 25b-3**).

1741 Quando comparado ao controle (**Figura 25a-2**), observamos que
1742 trofozoítos tratados com o composto KV-46, nas concentrações de 1 μM
1743 apresentou diminuição na expressão de tubulina acetilada (**Figura 25a-4**).
1744 Contudo, observamos que os trofozoítos tratados com o composto KV-46 na

1745 concentração de 5 μ M apresentou um leve aumento na expressão de tubulina
1746 acetilada. Importante ressaltar que o composto KV-49, um outro inibidor de
1747 histona desacetilase, promoveu uma leve modificação na expressão de tubulina
1748 acetilada (**Figura 25b-4**), o composto KV-49 foi utilizado apenas neste ensaio
1749 como um comparativo direto ao composto KV-46 para saber se haveria
1750 diferenças significativas. A Tubastatina A (**Figura 25a-6-7**) que foi a base para a
1751 construção dos compostos KV-46 e KV-49, e outros inibidores de HDACi classe
1752 I e II como Tricostatina (**Figura 25b-6-7**) e SAHAH (**Figura 25a-8 e 25b-8**)
1753 também foram utilizados para a comparação dos efeitos. O SAHAH foi o único
1754 capaz de ocasionar uma expressiva diminuição tanto na tubulina acetilada
1755 quanto na lisina-*H4K16ac* (dados não mostrados). As análises quantitativas de
1756 cada banda no gel foram feitas por densitometria usando o *software ImageJ* e
1757 os resultados dos resultados encontrados para a avaliação da tubulina acetilada
1758 mostrados na **Figura 25c**.

1759



1760

1761 **Figura 25. Western Blotting de enzimas de trofozoítos** expostos ou não aos
 1762 compostos HDACi classe I ou II na concentração de 1 μ M ou 5 μ M por 48 h. (**a-**
 1763 **1)** Banda Padrão. (**a-2)** Trofozoítos não tratados. (**a-3)** Parasitas tratados com
 1764 albendazol; (**a4-5)** Parasitas tratados com o composto KV-46 1 μ M (**a-4)** e KV-46

1765 5 μM (**a-5**); (**a6-7**) trofozoítos tratados com Tubastatina A (1 μM em **a-6**) e (5 μM
1766 em **a-7**) não apresentam grandes alterações na expressão das proteínas. (**b-1**)
1767 Banda Padrão; (**b-2**) Trofozoítos tratados com DMSO. (**b-3**) Trofozoítos tratados
1768 com Metronidazol; 4-5 Trofozoítos tratados com KV-49 1 μM (**b-4**) e KV-49 5 μM
1769 (**b-5**), (**b6-7**) Parasitos tratados com Tricostatina A 1 μM (**b-6**) e 5 μM (**b-7**), assim
1770 como a SAHAH 1 μM (**a-8**) e 5 μM (**b-8**). (**c**) Densitometria da tubulina acetilada.
1771 Os dados sugerem que os HDACi que foram capazes de alterar a expressão da
1772 tubulina acetilada foi o composto KV-46 1 μM e SAHAH que causou uma
1773 expressiva diminuição da tubulina acetilada nas duas concentrações. As
1774 análises quantitativas de cada banda no gel foram feitas por densitometria
1775 usando o *software ImageJ*.

1776

1777 6. DISCUSSÃO

1778 *Giardia intestinalis* é um protozoário de grande importância biológica por
1779 possuir características estruturais únicas, sendo utilizado como modelo para
1780 estudo de processos biológicos básicos em eucariotos (BENCHIMOL, 2005;
1781 CARRANZA et al., 2016). Soma-se a isso o fato desse protozoário ser o agente
1782 etiológico da giardíase, uma infecção intestinal caracterizada por diarreia,
1783 vômitos e perda de peso (CDC, 2018). Atualmente, a giardíase é considerada
1784 um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, visto que
1785 a prevalência da doença na população pode chegar a 30% (COELHO et al.,
1786 2017). Os idosos, pacientes imunocomprometidos e crianças são os principais
1787 grupos de risco. Estima-se que ocorra cerca de 58 milhões de casos por ano em
1788 crianças, com altas taxas de morbidade e mortalidade (SAVIOLI et al., 2006;
1789 COELHO et al., 2017).

1790 O tratamento da giardíase é baseado, principalmente, na administração
1791 de compostos da classe dos nitroimidazóis ou benzimidazóis (UZLIKOVA e
1792 NOHYNKOVA, 2014; LAGUNAS-RANGEL e BERMÚDEZ-CRUZ, 2019;
1793 OROZCO e GARLAPAT, 2020). Embora a terapia seja eficaz, estas drogas
1794 apresentam uma série de efeitos adversos. O *Food and Drug Administration*
1795 (FDA, 2018), agência reguladora de alimentos e medicamentos dos EUA, aponta
1796 que o metronidazol, uma das drogas de escolha para o tratamento da giardíase,
1797 apresenta atividade carcinogênica em ratos e camundongos (FDA, 2018). O
1798 albendazol possui efeito teratogênico e recomenda-se a sua administração em
1799 mulheres em idade fértil somente após o teste de gravidez (fda.gov). Além do
1800 exposto acima, a falta de êxito na terapia anti-*Giardia* tem sido reportada com
1801 todos os fármacos utilizados. Isto se deve em parte à infecção do hospedeiro por
1802 cepas resistentes aos compostos tradicionalmente empregados, visto que estas
1803 drogas foram introduzidas para o tratamento há cinco décadas (LAGUNAS-
1804 RANGEL e BERMÚDEZ-CRUZ, 2019; OROZCO e GARLAPAT, 2020).
1805 Considerando esses dados, é necessária a busca de diferentes vias do parasita
1806 que possam funcionar como potencial alvo para o desenvolvimento de novas
1807 drogas destinadas ao tratamento da doença.

1808 Atualmente, existem diversos estudos que apontam a regulação de
1809 mecanismos epigenéticos como uma via promissora para novos fármacos
1810 antiparasitários. Um desses mecanismos inclui a acetilação e desacetilação de
1811 histonas que são processos cruciais para inibir ou ativar a transcrição gênica
1812 (CARRANZA et al., 2016; GARGANTINI et al., 2016; SERRADELL et al., 2019;
1813 FRIEDRICH et al., 2020). A desacetilação de histonas é realizada por enzimas
1814 histonas desacetilases (HDAC) que são divididas convencionalmente em quatro
1815 classes. HDAC classe I e II, não precisam de NAD⁺ como co-substrato, possuem
1816 papel crucial na regulação da cromatina e na expressão gênica em células de
1817 mamíferos (FALKENBERG E JOHNSTONE, 2014). Em função das HDAC serem
1818 frequentemente superexpressas em diferentes tipos de cânceres e terem um
1819 envolvimento abrangente na regulação dos mecanismos principais na
1820 progressão do tumor (KRAUTKRAMER et al., 2017; RAMAKRISHNAN et al.,
1821 2016), os inibidores de HDAC (HDACi) foram aprovados pela *Food and Drug*
1822 *Administration* (FDA) para a terapia dessas doenças. Um desses HDACi é a
1823 tricostatina A (TSA), que é a base de ácido hidroxâmico e inibiu HDACs de classe
1824 I com IC₅₀ inferior a 10 nM, além de apresentar também grande seletividade
1825 contra HDACs classe II (FALKENBERG e JOHNSTONE, 2014; CHAIYAWAT et
1826 al., 2017; FRIEDRICH et al., 2020).

1827 Nas últimas décadas, a via de acetilação/desacetilação de histonas foi
1828 descrita em protozoários e a presença das enzimas HDAC confirmada no
1829 genoma desses organismos (ANDREWS et al., 2012; KRAUTKRAMER et al.,
1830 2017; ZUMA e de SOUZA, 2018). Nesse contexto, o uso de inibidores de HDAC
1831 torna-se uma alternativa interessante não somente para os estudos do papel
1832 funcional das HDAC nessas células, mas também como uma opção para o
1833 tratamento. Na literatura existem vários relatos sobre a atividade antiparasitária
1834 dos inibidores de HDAC atuando sobre a proliferação, viabilidade, ciclo celular e
1835 ultraestrutura de diversos protozoários (EHRENKAUFER et al., 2007; ENGEL et
1836 al., 2015; CAMPO, 2017; de OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; VACA et al., 2019).

1837 Frente ao exposto acima e com base no que tem sido testado em
1838 tratamentos alternativos com outros protozoários responsáveis por doenças
1839 tidas como negligenciadas, o presente estudo avaliou os efeitos de inibidores

1840 das enzimas histonas desacetilases (HDACi) denominados KV-24, KV-30, KV-
1841 46 e KV-50 em trofozoítos de *G. intestinalis*. Os compostos KVs contêm o grupo
1842 ácido hidroxâmico, que é conhecido por ser o catalizador para a reação da
1843 inibição das histonas desacetilases dependentes de zinco. Esses compostos
1844 foram projetados com base no potente e comercialmente disponível inibidor de
1845 HDAC1 e HDAC6, a Tubastatina A. Os compostos KV30 e KV50 inibem tanto
1846 HDAC1 quanto HDAC6 com atividades na escala de nanomolar. O composto
1847 KV-46 é um inibidor mais seletivo para a HDAC6, enquanto a atividade da KV-
1848 24 ainda não é definida (VOGERL et al., 2019).

1849 Nossas observações indicaram que, entre os quatro compostos testados
1850 (KV-24, KV-30, o KV-46 e KV-50), KV-46 foi o mais eficiente na redução da
1851 proliferação dos trofozoítos, apresentando valores de IC₅₀ de 3 µM (48 h) e 0,179
1852 µM (179 nm) (72 h). Esse efeito na inibição do crescimento foi semelhante ao
1853 encontrado com uso de outros inibidores de HDAC de classe I e II contra este
1854 parasita. Por exemplo, Emery e colaboradores (2018) relataram que o composto
1855 Tricostatina A foi altamente eficaz contra *Giardia*, obtendo um valor de IC₅₀ de
1856 1 µM mesmo em cepas resistentes ao metronidazol. Orozco e Garlapat (2020)
1857 mostraram que o TSA, na concentração de 2 mM, foi capaz de inibir 82.2% da
1858 proliferação do parasita em 48 h. Assim, a eficácia de inibidores de HDAC1 e 6
1859 em trofozoítos de *G. intestinalis* sugere que histona desacetilases HDAC de
1860 classe I e II poderiam ser alvos farmacológicos potenciais para quimioterapia da
1861 giardíase (SONDA et al., 2010; PRUCCA et al., 2011; CARRANZA et al., 2016).
1862 Baseando-se em dados genômicos de *Giardia* (<http://Giardiadb.org>), é possível
1863 verificar que existem seis genes que codificam para HDAC sendo somente um
1864 deles específico para HDAC classe I e os demais para HDAC classe III. Sonda
1865 e colaboradores (2010) demonstraram que existe apenas um homólogo HDAC
1866 (classe I) clássico no genoma de *Giardia* (GL50803-3281) e que este é crucial
1867 nos processos de diferenciação e na variação antigênica do trofozoíto.
1868 Consideramos os inibidores dessa classe de enzimas um excelente motivo de
1869 trabalho, pois a inibição da proliferação induzida por KV-46 foi maior que aquela
1870 observada para o metronidazol, o fármaco comumente utilizado no tratamento
1871 da giardíase.

1872 Os ensaios usando o diacetato de fluoresceína/ iodeto de propídeo
1873 mostraram que o composto KV-46 diminui a viabilidade do parasita em todas as
1874 concentrações usadas, porém essa alteração no percentual de parasitas viáveis
1875 foi estatisticamente significante somente a partir da administração de 10 μ M em
1876 48 h. Dados diferentes foram obtidos quando a viabilidade do trofozoíto foi
1877 avaliada pelo método colorimétrico usando os reagentes MTS/PMS. Nesses
1878 ensaios, a diminuição de células viáveis foi observada somente no tempo de 72
1879 h e após administração de 10 μ M do composto. O MTS é um sal tetrazólio de
1880 segunda geração que ao ser adicionado, com um segundo reagente o PMS, em
1881 meio com células metabolicamente viáveis, é reduzido por reação enzimática
1882 direta e através de cofatores como o NADH⁺ e o NADH. Somente as células
1883 viáveis conseguem metabolizar o MTS e, em consequência, o substrato muda
1884 de cor, formando um precipitado solúvel. Essa reação em células de mamífero
1885 acontece nas mitocôndrias e como *Giardia* não possui mitocôndrias típicas, isso
1886 poderia justificar a diferença de resultados obtidos entre o método de
1887 fluorescência (DAF e PI) e os dados colorimétrico (MTS/PMS). Comparando com
1888 a taxa de crescimento celular nas concentrações de 1-5 mM de KV-46, os dados
1889 obtidos sugerem que a droga tende a interferir de forma mais intensa na
1890 multiplicação do parasita do que na viabilidade, sendo a droga citotóxica
1891 somente nas concentrações mais altas (10 μ M e 20 μ M). De fato, observamos
1892 que parasitos tratados por 24 h com KV-46 apresentaram uma parada no seu
1893 ciclo celular, especificamente na fase G2/M. Vários estudos mostram que
1894 inibidores de HDAC classe I ou classe II e seus análogos podem induzir a parada
1895 do ciclo celular em várias linhagens de células, incluindo protozoários parasitas
1896 tais como, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei* e
1897 outras cepas de *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Trichomonas*
1898 *vaginalis*, *Echinococcus granulosus*, *Mesocestoides corti* entre outros
1899 (EHRENKAUFER et al., 2007; ENGEL et al., 2015; CAMPO, 2017; de OLIVEIRA-
1900 SANTOS et al., 2018; GUIDI et al., VACA et al., 2019).

1901 Na etapa seguinte, foi importante avaliar a citotoxicidade do composto KV-
1902 46, uma vez que esta droga é um derivado da Tubastatina A, que é um potente
1903 inibidor de HDAC6 em linhagens de células humanas, sendo capaz de induzir

1904 apoptose e alterações no ciclo celular (MOTTAMAL et al., 2015,
1905 VISHWAKARMA et al., 2013; URDICIAIN et al., 2019; DEPETTER et al., 2019).
1906 Escolhemos realizar esses ensaios utilizando células de linhagem epitelial do
1907 intestino humano (CACO-2). Essas células preservam características
1908 morfológicas e fenotípicas de células epiteliais intestinais como a morfologia
1909 polarizada, microvilosidades na superfície apical, expressão de enzimas de
1910 borda em escova e junções ocludentes típicas (*tight junctions*) (SAMBUI et al.,
1911 2005; URDICIAIN et al., 2019). Além disso, como os trofozoítos de *G. intestinalis*
1912 estabelecem o parasitismo em células epiteliais intestinais, essa linhagem é um
1913 bom modelo para os estudos de quimioterapia envolvendo esse protozoário.

1914 Neste contexto, nossos resultados usando MTS/PMS indicaram que não
1915 houve redução da viabilidade das células CACO-2, e que a atividade mitocondrial
1916 foi mantida. O ensaio mostrou apenas 5-10% de células inviáveis em todas as
1917 concentrações testadas. Por outro lado, a porcentagem de células inviáveis após
1918 a administração do formaldeído foi em torno de 90%. Esses dados indicam que,
1919 mesmo com concentrações dez a vinte vezes maiores que a IC₅₀ capaz de inibir
1920 a proliferação do parasita, o composto não foi citotóxico para as células CACO-
1921 2. Isso poderia sugerir uma seletividade da droga KV-46 pelo parasita pois os
1922 aminoácidos considerados críticos na atividade da HDAC1 humana, estão
1923 presentes *Giardia*, mas não possuem uma inserção AT e contém uma inserção
1924 única de quatro resíduos na posição 283-286, diferindo assim as HDACs de
1925 *Giardia* para as de mamífero (SONDA et al., 2010).

1926 A análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que o efeito
1927 primário do composto KV-46 foi a formação de protrusões na região dorsal do
1928 parasita. Essas protrusões, muitas vezes, foram observadas na região da
1929 superfície correspondente aos núcleos do trofozoíto e pareciam maiores

1930 conforme a concentração da droga aumentava. A formação dessas protrusões
1931 possivelmente está associada com o desenvolvimento de vacúolos no interior do
1932 parasita que, quando próximos à membrana plasmática, induziram uma
1933 elevação na região de superfície correspondente como observado por
1934 microscopia eletrônica de transmissão. Em concentrações mais elevadas do

1935 composto KV-46, pequenas rupturas de membrana poderiam ser vistas nesses
1936 locais (dados não mostrados).

1937 Os vacúolos observados nos trofozoítos tratados apresentavam em seu
1938 interior lamelas membranosas concêntricas (figuras mielínicas) e grânulos de
1939 glicogênio conferindo uma característica autofágica a essas estruturas. O
1940 tamanho desses vacúolos parecia aumentar com doses maiores do composto
1941 KV-46. Na literatura é descrito que diferentes tipos celulares quando em fase
1942 inicial de autofagia apresentam vários vacúolos autofágicos, que aumentam em
1943 número e volume nas etapas tardias do processo (BENCHIMOL, 1999; LEVINE
1944 e YUAN, 2005; KIEL, 2010; BRENNAND et al., 2011; DUSZENKO et al., 2011;
1945 GHARTEY-KWANSAH et al., 2020). Em outras células eucarióticas, também é
1946 comum a observação de retículo endoplasmático (CHAVEZ-VALDEZ et al.,
1947 2016) e mitocôndrias dilatadas em células autofágicas (WANG e LEVINE 2010;
1948 DUSZENKO et al., 2011). Vacúolos com figuras mielínicas, semelhantes aos
1949 observados nesse trabalho, foram mostrados em *G. intestinalis* após o
1950 tratamento com beta-lapachona (CORRÊA et al., 2009) e metronidazol
1951 (CAMPANATI e MONTEIRO-LEAL, 2002; MULLER et al., 2005).
1952 Interessantemente, trofozoítos ao serem incubados com inibidores de sirtuínas
1953 (HDAC classe III) também apresentaram essas estruturas em seu interior
1954 (GADELHA et al., 2019). Grandes vacúolos citoplasmáticos foram descritos em
1955 *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* após incubação com queratina
1956 (VILELA e BENCHIMOL, 2011) e em *Leishmania amazonensis* e *Leishmania*
1957 *major* depois da administração de VPS34-IN1 ou rapamicina (DIAS et al., 2018).
1958 As características ultraestruturais que o parasita apresenta após o tratamento
1959 com KV-46 (aumento de vacúolos, presença de figuras mielínicas e
1960 características autofágicas) leva a sugestão que as células podem estar em um
1961 processo de morte celular por autofagia. No entanto, essa hipótese precisa ser
1962 confirmada com ensaios experimentais complementares, com marcadores
1963 específicos como o LC3. Estudos posteriores deverão focar nesse ponto.

1964 Estudos anteriores mostraram que a inibição de histonas desacetilases
1965 classe I ou II atenuaria o processo autofágico em diferentes modelos celulares
1966 como por exemplo em células *HeLa* (RIKIISHI, 2011), linfomas não *Hodgkin*

1967 RIKIISHI, 2011), sarcoma uterino humano (MRAKOVČIĆ et al., 2017),
1968 macrófagos (CAMPBELL et al., 2014). A autofagia também pode estar associada
1969 a processos fisiológicos relacionadas ao desenvolvimento e diferenciação celular
1970 (WU et al., 2000; VOMMARO et al., 2014), bem como pode exercer um papel
1971 protetor na célula contra condições adversas em seu meio, como por exemplo
1972 privação de nutrientes (KROEMER et al., 2010; VOMMARO et al., 2014; DIAS et
1973 al., 2018). Como vacúolos com características autofágicas são comuns em *G.*
1974 *intestinalis* após incubação com diferentes tipos de drogas e, como visto em
1975 nosso trabalho, apareceram após a administração de baixas doses dos
1976 compostos aqui estudados, é possível que a via autofágica seja ativada, em um
1977 primeiro momento, para defesa da célula frente ao ambiente estressante.

1978 Além das alterações mencionadas acima em trofozoítos tratados com o
1979 composto KV-46 também foi observada a internalização de flagelos. Essa
1980 mudança é uma característica morfológica de trofozoítos quando observados
1981 nas primeiras horas do processo de encistamento (MIDDLEJ e BENCHIMOL,
1982 2009), o que levaria à sugestão que uma das reações dos trofozoítos frente ao
1983 estresse com o composto KV-46 também poderia ser a indução ao encistamento,
1984 ou seja, a diferenciação trofozoíto-cisto. Essa diferenciação, no entanto, não
1985 seria plenamente concluída pelo parasita, pois não foram observadas vesículas
1986 específicas de encistamento, a formação da parede cística ou cistos maduros,
1987 em nenhum ensaio realizado. Acresce a isso o fato de que inibidores de HDAC,
1988 como nicotinamida e FR235222, quando administrados em *G. intestinalis*
1989 bloqueiam a síntese de proteínas da parede cística e, portanto, inibem o
1990 encistamento (SONDA et al., 2010; CARRANZA et al., 2016). A internalização
1991 dos flagelos poderia estar associada à condição de estresse causada pela
1992 presença do composto KV-46 no meio. Na literatura, alguns autores já
1993 reportaram a internalização de flagelos ao tratar os trofozoítos de *G. intestinalis*
1994 com outras drogas. Busatti e colaboradores (2013) notaram esse efeito ao tratar
1995 trofozoítos com metronidazol por 48 h; Corrêa e Benchimol (2006) também
1996 reportaram o mesmo efeito ao tratar os trofozoítos com citocalasina D. É
1997 importante mencionar que a internalização dos flagelos poderia indicar que o
1998 composto KV-46 afetaria a regulação de tubulina. Porém, as análises por

1999 imunofluorescência mostraram que não houve modificação no padrão de
2000 marcação da tubulina em nenhuma das concentrações testadas quando
2001 comparadas ao controle. No entanto, os resultados com *Western Blotting*
2002 mostraram que a expressão da tubulina acetilada sofreu uma diminuição após a
2003 administração do composto KV-46 na concentração de 1 μ M e um sutil aumento
2004 na concentração de 5 μ M. Todavia, mais experimentos se fazem necessários
2005 para confirmar se de fato houve a alteração da tubulina acetilada nessas
2006 concentrações.

2007 A partir da administração de 10 μ M do composto KV-46 observamos, de
2008 forma mais intensa, células disformes e com número anormal de flagelos. Esse
2009 achado indicaria uma parada no ciclo celular na etapa de citocinese. Por
2010 microscopia eletrônica de transmissão, notamos que estruturas como núcleos,
2011 disco ventral e flagelos estão duplicados, mas que era comum observar perfis de
2012 mais de duas células ainda formando um só conjunto. Essas observações
2013 sugerem que as células tratadas entraram em divisão celular, mas sem, no
2014 entanto, completá-la., levando à formação de células multiflageladas. Os
2015 inibidores de HDAC em células de mamíferos (MOTTAMAL et al., 2015;
2016 RAMAKRISHNAN et al., 2016; KRAUTKRAMER et al., 2017) e outros
2017 protozoários (SHARIF et al., 2018; ZUMA e de SOUZA, 2018) podem interromper
2018 o ciclo celular e regular negativamente proteínas envolvidas na progressão e no
2019 controle do ciclo, efeito similar poderia estar ocorrendo em *G. intestinalis*
2020 (SONDA et al., 2010; GADELHA et al., 2019). Entretanto, apesar de não terem
2021 sido encontradas mudanças significativas na ultraestrutura do núcleo, assim
2022 como ocorre em mamíferos e em *T. cruzi* (de OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018;
2023 ZUMA e de SOUZA, 2018), é necessário ressaltar que na literatura já foi descrito
2024 que HDACi é capaz de modular a expressão gênica em diversos modelos como
2025 *Entamoeba histolytica* e *Plasmodium falciparum* (ANDREWS et al., 2012;
2026 CAMPO, 2017; EHRENKAUFER et al., 2007). Sendo assim, acreditamos que o
2027 efeito do KV-46 em nível nuclear seja mais sutil do que possa ser evidenciado
2028 por técnicas de microscopia. Ensaio moleculares mais específicos se fazem
2029 necessários a fim de comprovar se de fato o composto estaria agindo, ou não,
2030 sobre as desacetilases nucleares.

2031 É importante lembrar ainda que em *T. cruzi* foi descrita a capacidade do
2032 TSA, um inibidor de HDAC6, de modular a expressão gênica em transcritos
2033 envolvidos com divisão, diferenciação e ciclo celular em tripomastigotas
2034 (CAMPO, 2017). Embora haja esta grande dúvida acerca dos possíveis alvos do
2035 TSA em *T. cruzi*, de Oliveira Santos e colaboradores (2018) demonstraram que
2036 esse composto foi capaz de alterar o controle da acetilação da tubulina que é
2037 essencial para a divisão em tripanosomatídeos, levando também a instabilidade
2038 dinâmica dos microtúbulos e interferindo na metaciclologênese desses parasitas
2039 (de OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; ZUMA e de SOUZA, 2018).

2040 Diversos estudos já foram realizados nos últimos anos utilizando
2041 inibidores de histonas desacetilases classe I e II em protozoários parasitas
2042 (EHRENKAUFER et al., 2007; ENGEL et al., 2015; CAMPO, 2017; de OLIVEIRA-
2043 SANTOS et al., 2018; VACA et al., 2019). Essas pesquisas sugerem a eficácia
2044 desses compostos e o seu potencial para o desenvolvimento de fármacos no
2045 tratamento de diversas parasitoses. No que se refere ao parasita *G. intestinalis*,
2046 genes codificando para HDACs estão presentes no genoma e estudos funcionais
2047 mostraram que essas enzimas estão envolvidas no processo de diferenciação
2048 trofozoíto-cisto (SONDA et al., 2010) e na variação antigênica (CARRANZA et
2049 al., 2016; GARGANTINI et al., 2016), onde participariam do controle da
2050 expressão gênica das proteínas variantes específicas de superfície (VSPs).

2051 Em células de mamíferos, HDAC de classe II (HDAC6) pode influenciar
2052 na estabilidade de MTs e / ou nas propriedades dinâmicas, mas não é essencial
2053 para a montagem de microtúbulos ou formação dos dímeros de tubulina.
2054 Diferenças nos sítios de ligação entre os dímeros de tubulina encontrados de
2055 forma livre na célula e os dímeros de tubulina dos microtúbulos já montados,
2056 sugerem que essas diferenças substanciais interfiram na acetilação e
2057 desacetilação tubulina (ZHANG et al., 2003; SKULTETYOVA et al., 2017). Vale
2058 ressaltar ainda que uma única mutação em um desses domínios pode ser
2059 suficiente para eliminar toda a atividade da enzima.

2060 Nossos dados sugerem que os KV-46 pode ter alterado outra via em *G.*
2061 *intestinalis* que não seja só a da acetilação e desacetilação de tubulina. Efeito

2062 similar já foi relatado na literatura em outros protozoários como *T. cruzi* (de
2063 OLIVEIRA-SANTOS et al., 2018; ZUMA e de SOUZA, 2018).

2064 Tendo em vista os resultados obtidos, acreditamos que o composto KV-
2065 46 poderia ser considerado promissor no tratamento de giardíase pois, como
2066 aqui demonstrado, altera processos biológicos como a proliferação do parasita,
2067 induz modificações ultraestruturais, além de promover uma condição de estresse
2068 que resultaria em ativação de um mecanismo similar à autofagia. Importante
2069 ressaltar a baixa toxicidade do composto em linhagem de células intestinais
2070 humanas como nas células CACO-2 testadas neste trabalho. Embora haja
2071 similaridade entre as HDAC classe I de mamíferos e aquela presente em *Giardia*
2072 (SONDA et al., 2010), ensaios moleculares mais específicos se fazem
2073 necessários para determinar se o composto KV-46 estaria de fato agindo sobre
2074 as histonas desacetilases do parasito ou se outras vias estariam alteradas.

2075 7. CONCLUSÕES

- 2076 • O composto KV-46, que é um inibidor de histona desacetilases classe I e
2077 II, inibiu a proliferação de *G. intestinalis*, apresentando o valor de IC₅₀
2078 menor que o metronidazol, fármaco tradicionalmente empregado para o
2079 tratamento da giardíase.

- 2080 • A viabilidade do parasita foi alterada em 40% após administração de 10 µM
2081 do composto KV-46 por 24 h, 48 e 72 h indicando a citotoxicidade da droga.

- 2082 • O composto KV-46 não foi citotóxico para as células epiteliais intestinais
2083 CACO-2, sugerindo a seletividade da droga.

- 2084 • O ciclo celular do parasita foi alterado, mais especificamente na fase G2/M
2085 e células multiflageladas foram observadas indicando que a citocinese
2086 pode estar bloqueada nesses parasitas.

- 2087 • Trofozoítos tratados com KV-46 apresentaram vacúolos com figuras
2088 mielínicas e grânulos de glicogênio concentrados em grandes grupos, de
2089 modo diferente do controle, sugerindo que a droga ativaria o processo
2090 autofágico em trofozoítos.

- 2091 • O composto KV-46 alterou a regulação da tubulina acetilada nos trofozoítos
2092 tratados apenas com a menor concentração testada.

- 2093 • Os inibidores de histonas desacetilases mostraram-se como compostos
2094 que poderiam servir no desenvolvimento de fármacos alternativos para o
2095 tratamento da giardíase.

- 2096

2097 **8. REFERÊNCIAS**

- 2098 ADAM, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, 14,
2099 447-475, 2001. DOI: 10.1128/cmr.14.3.447-475.2001.
- 2100 ADAM, E.A., YODER, J.S., GOULD, L.H., HLAVSA, M.C., ARGANO,
2101 J.W. *Giardiasis* outbreaks in the United States, 1971–2011. **Epidemiology and**
2102 **Infection**, 144, 2790–280, 2016. DOI: 10.1017/S0950268815003040.
- 2103 ALLAIN, T., FEKETE, E., BURET, A.G. *Giardia* cysteine proteases: the teeth
2104 behind the smile. **Trends in Parasitology**, 35, 636-648, 2019. DOI:
2105 10.1016/j.pt.2019.06.003.
- 2106 ANDREWS, K.T., HAQUE, A., JONES, M.K. HDAC inhibitors in parasitic
2107 diseases. **Immunology and Cell Biology**, 90, 66–77, 2012. DOI:
2108 10.1038/icb.2011.97.
- 2109 BENCHIMOL, M. Hydrogenosome autophagy: An ultrastructural and
2110 cytochemical study. **Biology of the Cell**, 91, 165–174, 1999. DOI:
2111 10.1016/S0248-4900(99)80039-2.
- 2112 BENCHIMOL, M. Mitosis in: multiple modes of cytokinesis. **Protist**, 155, 33–44,
2113 2004. DOI: 10.1078/1434461000162
- 2114 BENCHIMOL, M. The nuclei of *Giardia lamblia*: new ultrastructural observations.
2115 **Archives of Microbiology**, 183, 160–168, 2005. DOI: 10.1007/s00203-004-
2116 0751-8
- 2117 BENCHIMOL, M., PIVA, B., CAMPANATI, L., DE SOUZA, W. Visualization of the
2118 funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron
2119 microscopy—new insights. **Journal of Structural Biology**, 147, 102-15, 2004.
2120 DOI: 10.1016/j.jsb.2004.01.017.
- 2121 BRENNAND, A., GUALDRÓN-LÓPEZ, M., COPPENS, I., RIGDEN, D.J.,
2122 GINGER, M. L., MICHELS, P.A.M. Autophagy in parasitic protists: Unique

- 2123 features and drug targets. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 177, 83–
2124 99, 2011. DOI: 10.1016/j.jsb.2004.01.017
- 2125 BURET, A.G. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*.
2126 **Parasite**, 15, 261-265, 2008. DOI: 10.1051/parasite/2008153261.
- 2127 BUSATTI, H.G.N.O., ALVES, R.J., SANTANA-ANJOS, K.G., GIL, F.F., CURY,
2128 M.C., VANNIER-SANTOS, M.A., GOMES, M.A. Effects of metronidazole
2129 analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization.
2130 **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 75, 160–164, 2013. DOI:
2131 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.001
- 2132 BUTLER, K.V., KALIN, J., BROCHIER, C., VISTOLI, G., LANGLEY, B.,
2133 KOZIKOWSKI, A.P. Rational design and simple chemistry yield a superior,
2134 neuroprotective HDAC6 inhibitor, Tubastatin A. **Journal of the American**
2135 **Chemical Society**, 132, 10842–10846, 2010. DOI: 10.1021/ja102758v.
- 2136 CAMPANATI, L., HOLLOSCHI, A., TROSTER, H., SPRING, H., DE SOUZA, W.,
2137 MONTEIRO-LEAL, L.H. Videomicroscopy observations of fast dynamic
2138 processes in the protozoon *Giardia lamblia*. **Cell Motility and the Cytoskeleton**,
2139 51, 213-224, 2002. DOI: 10.1002/cm.10026.
- 2140 CAMPANATI, L., MONTEIRO-LEAL, L.H. The effects of the antiprotozoal drugs
2141 metronidazole and furazolidone on trophozoites of *Giardia lamblia* (P1 strain).
2142 **Parasitology Research**, 88, 80-5, 2002. DOI: 10.1007/s004360100502.
- 2143 CAMPANATI, L., TROESTER, H., MONTEIRO-LEAL, L.H., SPRING, H.,
2144 TRENDELENBURG, M.F. AND DE SOUZA, W. Tubulin diversity in trophozoites
2145 of *Giardia lamblia*. **Histochemistry and Cell Biology**, 119, 323–331, 2003. DOI:
2146 10.1007/s00418-003-0517-4.
- 2147 CAMPBELL, G.R., BRUCKMAN, R.S., CHU, Y.L., SPECTOR, S.A. Autophagy
2148 Induction by Histone Deacetylase Inhibitors Inhibits *HIV* Type 1. **Journal of**
2149 **Biological Chemistry**, 290, 5028–5040, 2014. DOI:10.1074/jbc.m114.605428
- 2150

- 2151 CAMPO, V.A. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and
2152 resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene
2153 expression. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug**
2154 **Resistance**, 7, 23–33, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2016.12.003.
- 2155 CARRANZA, P.G., GARGANTINI, P.R., PRUCCA, C.G., TORRI, A., SAURA, A.,
2156 SVÄRD, S., LUJAN, H.D. Specific histone modifications play critical roles in the
2157 control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote
2158 *Giardia lamblia*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 81,
2159 32–43, 2016. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.10.010.
- 2160 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance
2161 of *Giardiasis* - United States, 2006-2008. **Morbidity and Mortality Weekly**
2162 **Report**, 59, 15-25, 2015. Disponivel em
2163 <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5906a2.>>
- 2164 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National**
2165 **center for emerging and zoonotic infectious diseases (ncezid) division of**
2166 **foodborne, waterborne, and environmental diseases (dfwed)**, 2018.
2167 Disponivel em <
2168 <https://www.cdc.gov/healthywater/surveillance/giardiasis/giardiasis-2018.html> >
- 2169 CHAIYAWAT, P., PRUKSAKORN, D., PHANPHAISARN, A., TEEYAKASEM, P.,
2170 KLANGJORHOR, J., SETTAKORN, J. Expression patterns of class I histone
2171 deacetylases in osteosarcoma: a novel prognostic marker with potential
2172 therapeutic implications. **Modern Pathology**, 31, 264–274, 2017. DOI:
2173 10.1038/modpathol.2017.125
- 2174 CHAVEZ-VALDEZ, R., FLOCK, D.L., MARTIN, L.J., NORTHINGTON, F.J.
2175 Endoplasmic reticulum pathology and stress response in neurons precede
2176 programmed necrosis after neonatal hypoxia-ischemia. **International Journal of**
2177 **Developmental Neuroscience**, 48, 58–70, 2016. DOI:
2178 10.1016/j.ijdevneu.2015.11.007

- 2179 COELHO, C.H., DURIGAN, M., LEAL, D.A.G., SCHNEIDER, A., de B., FRANCO,
2180 R. M. B., SINGER, S. M. *Giardiasis* as a neglected disease in Brazil: Systematic
2181 review of 20 years of publications. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11,
2182 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006005.
- 2183 CORRÊA, G., BENCHIMOL, M. *Giardia lamblia* behavior under cytochalasins
2184 treatment. **Parasitology Research**, 98, 250–256, 2006. DOI: 10.1007/s00436-
2185 005-0065-z.
- 2186 CORRÊA, G., VILELA, R., MENNA-BARRETO, R.F.S., MIDLEJ, V.,
2187 BENCHIMOL, M. Cell death induction in *Giardia lamblia*: Effect of beta-lapachone
2188 and starvation. **Parasitology International**, 58, 424–437, 2009. DOI:
2189 10.1016/j.parint.2009.08.006
- 2190 DALY, E.R., ROY S.J., BLANEY D.D., MANNING J.S., HILLV.R., XIAO L.,
2191 STULL, J.W. Outbreak of *Giardiasis* associated with a community drinking-water
2192 source. **Epidemiology and Infection**, 138, 491-500, 2009. DOI:
2193 10.1017/S0950268809990744.
- 2194 DE OLIVEIRA-SANTOS, J., ZUMA, A.A., DE LUNA, N.F.V., DA CUNHA,
2195 J.P.C., DE SOUZA, W., MOTTA, M.C.M. Trichostatin A induces *Trypanosoma*
2196 *cruzi* histone and tubulin acetylation: effects on cell division and microtubule
2197 cytoskeleton remodeling. **Parasitology**, 46, 543-552, 2018. DOI:
2198 10.1017/S0031182018001828.
- 2199 DEPETTER, Y., GEURS, S., DE VREESE, R., GOETHALS, S., VANDOORN, E.,
2200 LAEVENS, A., STEENBRUGGE, J., MEYER, E. DE TULLIO, P., BRACKE, M.,
2201 D'HOOOGHE, M., DE WEVER, O. Selective pharmacological inhibitors of HDAC6
2202 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models.
2203 **International Journal of Cancer**, 145, 735-747, 2019. DOI: 10.1002/ijc.32169.
- 2204 DI GENOVA, B.M., TONELLI, R.R. Infection strategies of intestinal parasite
2205 pathogens and host cell responses. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1-16 2016.
2206 DOI: 10.3389 / fmicb.2016.0025

- 2207 DIAS, B.R.S., de SOUZA, C.S., ALMEIDA, N. de J., LIMA, J.G.B., FUKUTANI,
2208 K.F., dos SANTOS, T.B.S., VERAS, P.S.T. Autophagic induction greatly
2209 enhances leishmania major intracellular survival compared to *Leishmania*
2210 *amazonensis* in CBA/j-Infected macrophages. **Frontiers in Microbiology**, 9, 1-
2211 15, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01890
- 2212 DUSZENKO, M., GINGER, M. L., BRENNAND, A., GUALDRÓN-LÓPEZ, M.,
2213 COLOMBO, M. I., COOMBS, G. H., MICHELS, P. A. M. Autophagy in protists.
2214 **Autophagy**, 7, 127–158, 2011. DOI: 10.3389 / fmicb.2016.0025
- 2215 EHRENKAUFER, G. M., HAQUE, R., HACKNEY, J. A., EICHINGER, D. J.,
2216 SINGH, U. Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba*
2217 *histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite.
2218 **Cellular Microbiology**, 9, 1426–1444, 2007. DOI: 10.1111/j.1462-
2219 5822.2006.00882.x.
- 2220 EMERY, S.J., BAKER, L., ANSELL, B.R.E., MIRZAEI, M., HAYNES, P.A.,
2221 MCCONVILLE, M.J., JEX, A.R. Differential protein expression and post-
2222 translational modifications in metronidazole-resistant *Giardia duodenalis*.
2223 **GigaScience**, 7 (4): giy024., 2018. DOI: 10.1093/gigascience/giy024.
- 2224 EMERY-CORBIN, S., GRÜTTNER, J., SVARD, S. Transcriptomic and proteomic
2225 analyses of *Giardia intestinalis*: intestinal epithelial cell interactions. **Advances in**
2226 **Parasitology**, 107, 139-171, 2019. DOI: 10.1016/bs.apar.2019.11.002.
- 2227 ENGEL, J.A., JONES, A.J., AVERY, V.M., SUMANADASA S.D.M., NG, S.S.,
2228 FAIRLIE, D.P., ADAMS, T.S., ANDREWS, K.T. Profiling the anti-protozoal
2229 activity of anti-cancer HDAC inhibitors against *Plasmodium* and *Trypanosoma*
2230 parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug**
2231 **Resistance**, 5, 117–126, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2015.05.004.
- 2232 ERLANDSEN, S.L., RUSSO, A.P., TURNER, J.N. Evidence for adhesive activity
2233 of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. **Journal of Eukaryotic**
2234 **Microbiology**, 51, 73-80, 2004. DOI: 10.1111 / j.1550-7408.2004.tb00165.x.

- 2235 FASO, C., HEHL, A.B. Membrane trafficking and organelle biogenesis in *Giardia*
2236 *lamblia*: use it or lose it. **International Journal for Parasitology**, 41, 471–480,
2237 2011. DOI: 10.1016/j.ijpara. 2010.12.014.
- 2238 FALKENBERG, K.J., JOHNSTONE, R.W. Histone deacetylases and their
2239 inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature**
2240 **Reviews Drug Discovery**, 13, 673 - 691, 2014. DOI: 10.1038/nrd4360.
- 2241 FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA). Metronidazole. **Hospira**, 2018.
2242 Disponivel em <
2243 https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/018890s052lbl.pdf
2244 >.
- 2245 FENG, J.M., YANG, C.L., TIAN, H.F., WANG, J.X., WEN, J.F. Identification and
2246 evolutionary analysis of the nucleolar proteome of *Giardia lamblia*. **Biomedicine**
2247 **Central Genomics**, 21, 269. 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-6679-9.
- 2248 FRIEDRICH, A., ASSMANN, A.S., SCHUMACHER, L., STUIJVENBERG, J.V.,
2249 KASSACK, M.U., SCHULZ, W. A., ROOS, W.P., HANSEN, F.K., PFLIEGER, M.,
2250 KURZ, T., FRITZ, G. In Vitro Assessment of the genotoxic hazard of novel
2251 hydroxamic Acid- and benzamide-type histone deacetylase inhibitors (HDACi).
2252 **International Journal of Molecular Sciences**, 2, 4747, 2020. DOI:
2253 10.3390/ijms21134747.
- 2254 FYODOROV, D.V., ZHOU, B.R., SKOULTCHI, A.I., BAI, Y. Emerging roles of
2255 linker histones in regulating chromatin structure and function. **Nature Reviews**
2256 **Molecular Cell Biology**, 19, 192–206, 2017. DOI: 10.1038/nrm.2017.94.
- 2257 GADELHA, A.P.R, BENCHIMOL, M., DE SOUZA, W., The structural organization
2258 of *Giardia intestinalis* cytoskeleton. **Advances in Parasitology**, 107, 1-23, 2019.
2259 DOI: 10.1016/bs.apar.2019.08.003.
- 2260 GADELHA, A.P.R., BRAVIM, B., VIDAL, J., REIGNAULT, L.C., COSME, B.,
2261 HUBER, K., BRACHER, F., DE SOUZA, W. Alterations on growth and cell
2262 organization of *Giardia intestinalis* trophozoites after treatment with KH-TFMDI,

- 2263 a novel class III histone deacetylase inhibitor. **International Journal of Medical**
2264 **Microbiology**, 309, 130-142, 2019. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.01.002.
- 2265 GARGANTINI, P.R., SERRADELL, M., DEL, C., RÍOS, D.N., TENAGLIA, A.H.,
2266 LUJÁN, H.D. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Current**
2267 **Opinion in Microbiology**, 32, 52–58, 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.04.017.
- 2268 GERWIG, G.J., VAN KUIK, J.A., LEEFLANG, B.R., KAMERLING, J.P.,
2269 Vliegenthart, J.F.G., KARR, C.D., JARROLL, E.L. The *Giardia intestinalis*
2270 filamentous cyst wall contains a novel (1-3) -N-acetyl-D-galactosamine polymer:
2271 a structural and conformational study. **Glycobiology**, 143, 153-63, 2002. DOI:
2272 10.1093 / glycob / cwf059
- 2273 GHARTEY-KWANSAH, G., ADU-NTI, F., ABOAGYE, B., ANKOBIL, A.,
2274 ESSUMAN, E. E., OPOKU, Y. K., BOAMPONG, J. N. Autophagy in the control
2275 and pathogenesis of parasitic infections. **Cell & Bioscience**, 10, 101- 110, 2020.
2276 DOI: 10.1186/s13578-020-00464-6
- 2277 GILLIN, F.D., BOUCHER, S.E., ROSSI, S.S., REINER, D.S. *Giardia lamblia*: The
2278 roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro.
2279 **Experimental Parasitology**, 69, 164–17, 1989. DOI: 10.1016/0014-
2280 4894(89)90185-9.
- 2281 GUTIÉRREZ, A.M.Q. *Giardiasis* Epidemiology. **Current Topics in Giardiasis**, 2,
2282 14-24, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.70338.
- 2283 HAGEN, K.D., MCINALLY, S.G., HILTON, N.D., DAWSON, S.C., Microtubule
2284 organelles in *Giardia*. **Advances in Parasitology**, 107, 25-96, 2020. DOI:
2285 10.1016/bs.apar.2019.11.001.
- 2286 HAKAMI, N.Y., DUSTING, G.J., PESHAVARIYA, H.M. Trichostatin A, a histone
2287 deacetylase inhibitor suppresses NADPH oxidase 4-derived redox signaling and
2288 angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 20, 1932–1944,
2289 2016. DOI: 10.1111/jcmm.12885.

- 2290 HARRISON, I.F., POWELL, N.M., DEXTER, D.T. The histone deacetylase
2291 inhibitor nicotinamide exacerbates neurodegeneration in the lactacystin rat model
2292 of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, 148, 136-156, 2018. DOI:
2293 10.1111/jnc.14599.
- 2294 HENNEMAN, B., VAN EMMERIK, C., VAN INGEN, H., DAME, R.T. Structure and
2295 function of archaeal histones. **PLOS Genetics**, 14, 1-21, 2018. DOI:
2296 10.1371/journal.pgen.1007582.
- 2297 HENRIQUES, C., MOREIRA, T.L.B., MAIA-BRIGAGÃO, C., HENRIQUES-
2298 PONS, A., CARVALHO, T.M.U., DE SOUZA, W. Tetrazolium salt-based
2299 methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy.
2300 **Analytical Methods**, 3, 2148-2155, 2011. DOI: 10.1039/c1ay05219e.
- 2301 HOLBERTON, D.V., Fine structure of the ventral disc apparatus and the
2302 mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. **Journal of Cell**
2303 **Science**, 13, 11-41, 1973. Disponível em <
2304 <https://jcs.biologists.org/content/joces/13/1/11.full.pdf>>.
- 2305 HOLBERTON, D.V., Attachment of *Giardia*: hydrodynamic model based on
2306 flagellar activity. **Journal of Experimental Biology**, 60, 207-221, 1974.
2307 Disponível em < <https://jeb.biologists.org/content/jexbio/60/1/207.full.pdf>>.
- 2308 HUBBERT, C., GUARDIOLA, A.; SHAO, R., KAWAGUCHI, Y. ITO, A., NIXON,
2309 A., YOSHIDA, M., WANG, X.F., YAO, T.P. HDAC6 is a microtubule-associated
2310 deacetylase. **Nature**, 417, 455–458, 2002. DOI: 10.1038/417455a.
- 2311 HULL, E.E., MONTGOMERY, M.R., LEYVA, K.J. HDAC Inhibitors as epigenetic
2312 regulators of the immune system impacts on cancer therapy and inflammatory
2313 diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2016, 1–15, 2016. DOI:
2314 10.1155 / 2016/8797206.
- 2315 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA (IBGE). Pesquisa de Informações
2316 Básicas Municipais. Perfil dos Municípios Brasileiros Saneamento básico
2317 Aspectos gerais da gestão da política de saneamento básico. **Plano Municipal**

- 2318 **de Saneamento Básico**, 18, 1-10, 2017. Disponível em
2319 <[http://www.tratabrasil.org.br/uploads/Munic2017-Saneamento-](http://www.tratabrasil.org.br/uploads/Munic2017-Saneamento-Aspectosgestao.pdf)
2320 [Aspectosgestao.pdf](http://www.tratabrasil.org.br/uploads/Munic2017-Saneamento-Aspectosgestao.pdf)>.
- 2321 JEDELSKÝ, P.L., DOLEŽAL, P., RADA, P., PYRIH, J., ŠMÍD, O., HRDÝ, I.,
2322 TACHEZY, J. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic
2323 protist *Giardia intestinalis*. **PLoS ONE**, 6,1-44, 2011. DOI: 10.1371 /
2324 journal.pone.0017285.
- 2325 JIMENEZ-GARCIA, L., ZAVALA, G., CHÁVEZ-MUNGUÍA, B., RAMOS-
2326 GODÍNEZ, M., LOPEZ-VELÁSQUEZ, G., SEGURA-VALDEZ, M., ORTEGA-
2327 PÍERES, G. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia*
2328 *duodenalis*. **International Journal for Parasitology**, 38, 1297–1304, 2008. DOI:
2329 10.1016/j.ijpara.2008.04.012.
- 2330 JIRÁKOVÁ, K., KULDA, J., NOHÝNKOVÁ, E. How nuclei of *Giardia* pass through
2331 cell differentiation: semi-open mitosis followed by nuclear interconnection.
2332 **Protist**, 163, 465–479, 2012. DOI: 10.1016/j.protis.2011.11.008.
- 2333 KIEL, J.A.K.W. Autophagy in unicellular eukaryotes. **Philosophical**
2334 **Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 365, 819–830,
2335 2010. DOI: 10.1098/rstb.2009.0237
- 2336 KIM, D.W., PARK, J., YOON, B., BAEK, M.J, KIM, J.E., KIM S.Y. Metronidazole
2337 induced encephalopathy. **Journal of the Neurological Sciences**, 224, 107-111,
2338 2004. DOI: 10.1016/j.jns.2004.06.012.
- 2339 KIM, J.E., PARK, S.J. Role of gamma-giardin in ventral disc formation of *Giardia*
2340 *lamblia*. **Parasites & Vectors**, 12, 227, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3478-8.
- 2341 KORNBERG, R.D. Chromatin Structure: a repeating unit of histones and DNA.
2342 **Science**, 184, 868–871, 1974. DOI: 10.1126/science.184.4139.868.
- 2343 KRAUTKRAMER K.A., REY F.E., DENU J.M. Chemical signaling between gut
2344 microbiota and host chromatin: What is your gut really saying? **Journal of**
2345 **Biological Chemistry**. 292, 8582–859, 2017. DOI: 10.1074 / jbc.R116.761577.

- 2346 KROEMER, G., MARINO, G., LEVINE, B. Autophagy and the Integrated stress
2347 response. **Molecular Cell**, 40, 280–293, 2010. DOI:
2348 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
- 2349 KURDISTANI, S.K., GRUNSTEIN, M. Histone acetylation and deacetylation in
2350 yeast. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 4, 276–284, 2003. DOI:
2351 10.1038/nrm1075.
- 2352 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
2353 of bacteriophage T4. **Nature**, 15: 680-685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0.
- 2354 LAGUNAS-RANGEL, F.A., BERMÚDEZ-CRUZ, R.M. Epigenetics in the early
2355 divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: an update. **Biochimie**, 156, 123–128,
2356 2019. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.10.008.
- 2357 LANE S., LLOYD, D. Current trends in research into the waterborne parasite
2358 *Giardia*. **Critical Reviews in Microbiology**, 28, 123–14, 2002. DOI:
2359 10.1080/1040-840291046713.
- 2360 LANFREDI-RANGEL, A., ATTIAS, M., DE CARVALHO, T.M., KATTENBACH,
2361 W.M., DE SOUZA, W. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive
2362 protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to
2363 lysosomes. **Journal of Structural Biology**, 123, 225–235, 1998. DOI:
2364 10.1006/jsbi.1998.4035.
- 2365 LAUWAET, T., DAVIDS, B.J., REINER, D.S., E GILLIN, F.D. Encystation of
2366 *Giardia lamblia*: a model for other parasites. **Current Opinion in Microbiology**,
2367 10, 554–559, 2007. DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.011.
- 2368 LENAGHAN, S.C., DAVIS, C.A., HENSON, W.R., ZHANG, Z., ZHANG, M. High-
2369 speed microscopic imaging of flagella motility and swimming in *Giardia lamblia*
2370 trophozoites, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108, E550–
2371 E558, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1106904108.
- 2372 LEVINE, B., YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **Journal of**
2373 **Clinical Investigation**, 115, 2679–2688, 2005. DOI: 10.1172/jci26390

- 2374 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein
2375 measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**,
2376 193: 265-275, 1951. Disponivel em: <https://www.jbc.org/content/193/1/265.long>.
- 2377 LUJAN, H.D. Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*.
2378 **Essays in Biochemistry**, 51, 177–191, 2011. DOI: 10.1042/bse0510177.
- 2379 LUJAN, H.D., MOWATT, M.R., CONRAD, J.T., BOWERS, B., NASH, T.E.
2380 Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats.
2381 Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst
2382 wall. **Journal of Biological Chemistry**, 27, 29307-13, 1995. DOI:
2383 10.1074/jbc.270.49.29307.
- 2384 LYU, Z., SHAO, J., XUE, M., YE, Q., CHEN, B., QIN, Y., WEN, J. A new species
2385 of *Giardia künstler*, 1882 (*Sarcomastigophora: Hexamitidae*) in hamsters.
2386 **Parasites & Vectors**, 11, 202, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2786-8.
- 2387 MACDONALD, L.M., ARMSON, A., THOMPSON, A.R., REYNOLDFSON, J.A.
2388 Characterization of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia*
2389 *duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*.
2390 **Molecular and Biochemical Parasitology**, 138, 89-96, 2004. DOI:
2391 10.1016/j.molbiopara.2004.08.001.
- 2392 MARIANTE, R.M., VANCINI, R.G., MELO, A.L., BENCHIMOL, M. *Giardia*
2393 *lamblia*: Evaluation of the *in vitro* effects of nocodazole and colchicine on
2394 trophozoites. **Experimental Parasitology**, 110, 62–72, 2005. DOI:
2395 10.1016/j.exppara.2005.01.007.
- 2396 MCCAWE, T.R., RANDALL, T.D., FORERO, A., BUCHSBAUM, D.J. Modulation
2397 of antitumor immunity with histone deacetylase inhibitors. **Immunotherapy**, 9,
2398 1359–1372, 2017. DOI: 10.2217/imt-2017-0134.
- 2399 MELLOR, J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. **Trends in Genetics**,
2400 22, 320–329, 2006. DOI: 10.1016/j.tig.2006.03.008.

- 2401 MIDDLEJ, V., BENCHIMOL, M. *Giardia lamblia* behavior during encystment: How
2402 morphological changes in shape occur. **Parasitology International**, 58, 72–80,
2403 2009. DOI: 10.1016/j.parint.2008.11.002.
- 2404 MIDDLEJ, V., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. The endomembrane system of
2405 *Giardia intestinalis*. **Current Topics in Giardiasis**, 6, 88-108, 2017. DOI:
2406 10.5772/intechopen.70875
- 2407 MIDDLEJ, V., MEINIG, I., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. A new set of
2408 carbohydrate-positive vesicles in encysting *Giardia lamblia*. **Protist**, 164, 261–
2409 271, 2013. DOI: 10.1016/j.protis.2012.11.001.
- 2410 MIDDLEJ, V., PENHA, L., SILVA, R., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. Mitosomal
2411 chaperone modulation during the life cycle of the pathogenic protist *Giardia*
2412 *intestinalis*. **European Journal of Cell Biology**, 95, 531-542, 2016.
2413 DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.08.005.
- 2414 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Coordenação geral
2415 de desenvolvimento da epidemiologia em serviços. **Guia de Vigilância em**
2416 **Saúde**, 1, 218 -23, 2017. Disponível em:
2417 https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf.
- 2418 MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL. Sistema Nacional de
2419 Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos –
2420 2017. **Secretaria Nacional de Saneamento – SNS**. Brasília: SNS/MDR, 2019.
2421 Disponível em:
2422 [http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2018/Diagnostico_AE2018.p](http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2018/Diagnostico_AE2018.pdf)
2423 [df](http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2018/Diagnostico_AE2018.pdf).
- 2424 MORCH, K., HANEVIK, K. Giardiasis treatment: an update with a focus on
2425 refractory disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 33, 355–364,
2426 2020. DOI: 10.1097/qco.0000000000000668.
- 2427 MORRISON, H.G., MCARTHUR, A.G., GILLIN, F.D., ALEY, S.B., ADAM, R.D.,
2428 OLSEN, G.J., SOGIN, M.L. Genomic minimalism in the early diverging intestinal

- 2429 parasite *Giardia lamblia*. **Science**, 317, 1921–1926, 2007. DOI:
2430 10.1126/science.1143837.
- 2431 MOTTAMAL, M., ZHENG, S., HUANG, T.L., AND WANG, G. Histone
2432 deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer
2433 agents. **Molecules** 20, 3898–3941, 2015. DOI: 10.3390/molecules20033898.
- 2434 MOYANO, S., MUSSO, J., FELIZIANI, C., ZAMPONI, N., FRONTERA, L.,
2435 ROPOLO, A.S., LANFREDI-RANGEL, A., LALLE, M., TOUZ, M. Exosome
2436 biogenesis in the protozoa parasite *Giardia lamblia*: a model of reduced
2437 interorganellar crosstalk. **Cells**, 8, 2-20, 2019. DOI: 10.3390/cells8121600.
- 2438 MRAKOVČIĆ, M., KLEINHEINZ, J., FRÖHLICH, L.F. Histone deacetylase
2439 inhibitor-induced autophagy in tumor cells: implications for p53. **International**
2440 **Journal of Molecular Sciences**, 18, 4-29, 2017. DOI: 10.3390/ijms18091883.
- 2441 MULLER, J., HEMPHILL, A., MÜLLER, N. Physiological aspects of nitro drug
2442 resistance in *Giardia lamblia*. **International Journal for Parasitology: Drugs**
2443 **and Drug Resistance**, 8, 271–277, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.04.008.
- 2444 MULLER, J., RUHLE, G., MULLER, N., ROSSIGNOL, J.F., HEMPHILL, A. In
2445 Vitro Effects of Thiazolides on *Giardia lamblia* WB clone C6 cultured axenically
2446 and in coculture? with Caco2 cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,
2447 50, 162–170, 2006. DOI: 10.1128/AAC.50.1.162-170.2006.
- 2448 NOHYNKOVÁ, E. Localization of gamma-tubulin in interphase and mitotic cells
2449 of a unicellular eukaryote. **European Journal of Cell Biology**, 79, 438–445,
2450 2000. DOI: 10.1078/0171-9335-00066.
- 2451 NOSALA, C., DAWSON, S.C. The critical role of the cytoskeleton in the
2452 pathogenesis of *Giardia*. **Current Clinical Microbiology Reports**, 2, 155–162,
2453 2015. DOI: 10.1007/s40588-015-0026-y.
- 2454 NOSALA, C., HAGEN, K.D., DAWSON, S.C. “Disc-o-Fever”: getting down with
2455 *Giardia*’s groovy microtubule organelle. **Trends in Cell Biology**, 28, 99–112,
2456 2018. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.10.007.

- 2457 OROZCO, D.R., GARLAPATI, S. Histone deacetylase inhibitors induce
2458 expression of chromosomally tagged variant-specific surface protein genes in
2459 *Giardia lamblia*. **BMC Research Notes**, 13, 141-148, 2020. DOI:
2460 10.1186/s13104-020-04995-6.-
- 2461 OSLEY, M.A. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. **Annual**
2462 **Review of Biochemistry**, 60, 827–861, 1991. DOI:
2463 10.1146/annurev.bi.60.070191.004143.
- 2464 PIVA, B., BENCHIMOL, M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural
2465 study. **Biology of the Cell**, 96, 735-46, 2004. DOI:
2466 10.1016/j.biolcel.2004.05.006.
- 2467 PRUCCA, C.G., RIVERO, F. D., LUJÁN, H.D. Rregulation of antigenic variation
2468 in *Giardia lamblia*. **Annual Review of Microbiology**, 65, 611–630, 2011. DOI:
2469 10.1146/annurev-micro-090110-102940.
- 2470 RAMAKRISHNAN, S., SHENG, Y.K., ERIC C., KIERSTEN, M.M., KRIS, A.,
2471 SREENIVASULU, C., LI, S., LEIGH, E., PAULA S., WENDY S., RAY H., DYLAN,
2472 C., ASHLEY, O., GOKUL D., ROBERTO, P. HDAC 1 and 6 modulate cell invasion
2473 and migration in clear cell renal cell carcinoma. **Biomedicine Central Cancer**,1,
2474 16,1-15, 2016. DOI: 10.1186/s12885-016-2604-7.
- 2475 REGOES, A., ZOURMPANOU, D., LEÓN-AVILA, G., VAN DER GIEZEN, M.,
2476 TOVAR, J., HEHL, A.B. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial
2477 mitochondrion. **Journal of Biological Chemistry**, 280, 30557-63, 2005. DOI:
2478 10.1074/jbc.M500787200.
- 2479 RIKIISHI, H. Autophagic and Apoptotic Effects of HDAC Inhibitors on Cancer
2480 Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011, 1–9, 2011. DOI:
2481 10.1155/2011/830260
- 2482 ROUT, S., ZUMTHOR, J.P., SCHRANER, E.M., FASO, C., HEHL, A.B. An
2483 interactome-centered protein discovery approach reveals novel components

- 2484 involved in mitosome function and homeostasis in *Giardia lamblia*. **PLOS**
2485 **Pathogens**, 12,1-35, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006036
- 2486 SAGHAUG, C.S., KLOTZ, C., KALLIO, J.P., BRATTBAKK, H.R., STOKOWY, T.,
2487 AEBISCHER, T., HANEVIK, K. Genetic variation in metronidazole metabolism
2488 and oxidative stress pathways in clinical *Giardia lamblia* assemblage A and B
2489 isolates **Infection and Drug Resistance**, 12, 1221–1235, 2019. DOI:
2490 10.2147/IDR.S177997
- 2491 SAMBUY, Y., DE ANGELIS, I., RANALDI, G., SCARINO, M.L., STAMMATI, A.,
2492 ZUCCO F. The Caco2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of
2493 cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell**
2494 **Biology Toxicology**, 21, 1-26, 2005. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.
- 2495 SANDHU, H., MAHAJAN, R.C., GANGULY, N.K. Flowcytometric assessment of
2496 the effect of drugs on *Giardia lamblia* trophozoites in vitro. **Molecular and**
2497 **Cellular Biochemistry** 265, 151–160, 2004. DOI:
2498 10.1023/b:mcbi.0000044392.01704.5f.
- 2499 SANTANA, L.A., VITORINO, R.R., ANTONIO, V.E., MOREIRA, T.R., GOMES,
2500 A.P. Atualidades sobre giardíase. **Jornal Brasileiro de Medicina**, 102, 1-4,
2501 2014. Disponível em < [http://files.bvs.br/upload/S/0047-](http://files.bvs.br/upload/S/0047-2077/2014/v102n1/a4019.pdf)
2502 [2077/2014/v102n1/a4019.pdf](http://files.bvs.br/upload/S/0047-2077/2014/v102n1/a4019.pdf)>
- 2503 SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, A. *Giardia and Cryptosporidium* join the
2504 neglected diseases initiative. **Trends in Parasitology**, 22, 203–208, 2006. DOI:
2505 10.1016/j.pt.2006.02.015.
- 2506 SCHNEIDER, A., CHATTERJEE, S., BOUSIGES, O., SELVI, B.R.,
2507 SWAMINATHAN, A., CASSEL, R., BOUTILLIER, A.L. Acetyltransferases (HATs)
2508 as targets for neurological therapeutics. **Neurotherapeutics**, 10, 568–588, 2013.
2509 DOI: 10.1007/s13311-013-0204-7.
- 2510 SERRADELL, M.C., RUPIL, L.L., MARTINO, R.A., PRUCCA, C.G., CARRANZA,
2511 P.G., SAURA, A., LUJÁN, H.D. Efficient oral vaccination by bioengineering virus-

- 2512 like particles with protozoan surface proteins. **Nature Communications**, 10, 361-
2513 376, 2019. DOI: 10.1038/s41467-018-08265-9.
- 2514 SHARIF, T., MARTELL, E., DAI, C., GHASSEMI-RAD, M.S., HANES, M.R.,
2515 MURPHY, P.J., GUJAR, S. HDAC6 differentially regulates autophagy in stem-
2516 like versus differentiated cancer cells. **Autophagy**, 5, 686-706, 2018. DOI:
2517 10.1080/15548627.2018.1548547
- 2518 SKULTETYOVA, L., USTINOVA, K., KUTIL, Z., NOVAKOVA, Z., PAVLICEK, J.,
2519 MIKESOVA, J., BARINKA, C. Human histone deacetylase 6 shows strong
2520 preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Scientific Reports*, 7,
2521 1-13, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-11739-3
- 2522 SONDA, S., MORF, L., BOTTOVA, I., BAETSCHMANN, H., REHRAUER, H.,
2523 CAFLISCH, A., HEHL, A.B. Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation
2524 in the minimized protozoan *Giardia lamblia*. **Molecular Microbiology**, 76, 48-
2525 67, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07062.x.
- 2526 THOMPSON R.C., HOPKINS R., HOMAN W. Nomenclature and genetic
2527 groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today**, 16, 210-213,
2528 2000. DOI: 10.1016/s0169-4758(99)01624-5.
- 2529 TIAN, X.F., YANG, Z.H., SHEN, H., ADAM, R.D., LU, S.Q. Identification of the
2530 nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM. **Parasitology Research**, 106,
2531 789-793, 2010. DOI: 10.1007/s00436-009-1715-3.
- 2532 TOVAR, J., LEON-AVILA, G., SANCHEZ, L.B., SUTAK, R., TACHEZY, J., VAN
2533 DER GIEZEN, M., HERNANDEZ, M., MULLER, M., LUCOCQ, J.M. Mitochondrial
2534 remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. **Nature**,
2535 **London**, 6963, 172-176, 2003. DOI: 10.1038/nature01945.
- 2536 TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins
2537 from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some
2538 applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 76,
2539 4350-43, 1979. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

- 2540 UPCROFT, J., MITCHELL, R., CHEN, N., UPCROFT, P. Albendazole resistance
2541 in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino
2542 acid 200 in β -Tubulin. **Microbial Drug Resistance**, 2, 303–308, 1996. DOI:
2543 10.1089/mdr.1996.2.303
- 2544 URDICIAIN, A ERAUSQUIN E., MELÉNDEZ, B., REY, J., IDOATE, M.,
2545 CASTRESANA, J. Tubastatina A, an inhibitor of HDAC6, enhances
2546 temozolomide-induced apoptosis and reverses the malignant phenotype of
2547 glioblastoma cells. **International Journal of Oncology**, 54, 1797-1808, 2019.
2548 DOI: 10.3892/ijo.2019.4739.
- 2549 UZLIKOVA, M., NOHYNKOVA, E. The effect of metronidazole on the cell cycle
2550 and DNA in metronidazole-susceptible and -resistant *Giardia* cell lines.
2551 **Molecular and Biochemical Parasitology**, 198, 75–81, 2014. DOI:
2552 10.1016/j.molbiopara.2015.01.005.
- 2553 VACA, H.R., CELENTANO, A.M., MACCHIAROLI, N., KAMENETZKY, L.,
2554 CAMICIA, F., ROSENZVIT, M. Histone deacetylase enzymes as potential drug
2555 targets of neglected tropical diseases caused by cestodes, **International**
2556 **Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 9,120-132, 2019. DOI:
2557 10.1016/j.ijpddr.2019.02.003.
- 2558 VEIGA-SANTOS, P., REIGNAULT, L.C., HUBER, K., BRACHER, F., DE
2559 SOUZA, W., DE CARVALHO, T.M.U. Inhibition of NAD⁺-dependent histone
2560 deacetylases (sirtuins) causes growth arrest and activates both apoptosis and
2561 autophagy in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, 14,
2562 814–825, 2014. DOI: 10.1017/s0031182013001704
- 2563 VERÇOZA, B.R.F., GODINHO, J.L.P., DE MACEDO-SILVA, S.T., HUBER, K.,
2564 BRACHER, F., DE SOUZA, W., RODRIGUES, J.C.F. KH-TFMDI, a novel sirtuin
2565 inhibitor, alters the cytoskeleton and mitochondrial metabolism promoting cell
2566 death in *Leishmania amazonensis*, **Apoptosis**, 22, 1169–1188, 2017. DOI:
2567 10.1007/s10495-017-1397-8.

- 2568 VILELA, R.C., BENCHIMOL, M. Interaction of *Trichomonas vaginalis* and
2569 *Tritrichomonas foetus* with keratin: an important role in parasite infection.
2570 **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 106, 701–704, 2011. DOI:
2571 10.1590/s0074-02762011000600009
- 2572 VISHWAKARMA, S., IYER, L.R., MULEY, M., SINGH, P.K., SHASTRY, A.,
2573 SAXENA, A., NARAYANAN, S. Tubastatin, a selective histone deacetylase 6
2574 inhibitor shows anti-inflammatory and anti-rheumatic effects. **International**
2575 **Immunopharmacology**, 16, 72–78, 2013. DOI: 10.1016/j.intimp.2013.03.016.
- 2576 VOGERL, K., ONG, N., SENGER, J., HERP, D., SCHMIDTKUNZ, K., MAREK,
2577 M., BRACHER, F. Synthesis and biological investigation of phenothiazine-based
2578 benzhydroxamic acids as selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors.
2579 **Journal of Medicinal Chemistry**, 62, 1138-1166, 2019. DOI:
2580 10.1021/acs.jmedchem.8b01090.
- 2581 VOMMARO R.C, ATTIAS M, DE SOUZA W. A interação de *Toxoplasma gondii*
2582 com a célula hospedeira. In: SOUZA, W., and BELFORT JR., R., comp.
2583 **Toxoplasmose & Toxoplasma gondii [online]**. 1, 69-81, 2014. ISBN: 978-85-
2584 7541-571-9.
- 2585 WAMPFLER, P.B., TOSEVSKI, V., NANNI, P., SPYCHER, C., HEHL, A.B.
2586 Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. **PLoS ONE**,
2587 9, 1-19, 2014. DOI: 10.1371 / journal.pone.0094089.
- 2588 WOESSNER, D.J, DAWSON, S.C. The *Giardia* median body protein is a ventral
2589 disc protein that is critical for maintaining a domed disc conformation during
2590 attachment. **Eukaryotic Cell**, 11:292-301, 2012. DOI: 10.1128/EC.05262-11.
- 2591 WU, G., MCARTHUR A.G., FISER A., SALI A., SOGIN M.L., MLLERM, M. Core
2592 histones of the amitochondriate protist *Giardia lamblia*. **Molecular Biology and**
2593 **Evolution**, 17, 1156–1163, 2000. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026398.

- 2594 YANG, H.W., YONG, T.S., LEE, J.H., IM, K., PARK, S.J. Characterization of two
2595 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes in *Giardia lamblia*.
2596 **Parasitology Research**, 88, 646–650, 2002. DOI: 10.1007/s00436-002-0627-2
- 2597 YEE, J., TANG, A., LAU, W.L., RITTER, H., DELPORT, D., PAGE, M., ADAM,
2598 R.D., MÜLLER, M., WU. G. Core histone genes of *Giardia intestinalis*: genomic
2599 organization, promoter structure, and expression. **Biomedical Molecular**
2600 **Biology**, 8, 26-41, 2007. DOI: 10.1186/1471-2199-8-26
- 2601 ZAMPONI, N., ZAMPONI, E., MAYOL, G.F., LANFREDI-RANGEL, A., SVÄRD,
2602 S.G., TOUZ, M.C. Endoplasmic reticulum is the sorting core facility in the Golgi-
2603 lacking protozoan *Giardia lamblia*. **Traffic**, 18, 604–621, 2017. DOI:
2604 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026398.
- 2605 ZHANG, Y., LI, N., CARON, C., MATTHIAS, G., HESS, D., KHOCHBIN, S.,
2606 MATTHIAS, P. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules
2607 in vivo. **The European Molecular Biology Organization Journal**, 22, 1168–
2608 1179, 2003. DOI: 10.1093/emboj/cdg115
- 2609 ZUIDERVAART H.J., ANDERSON, D. Antony van Leeuwenhoek's microscopes
2610 and other scientific instruments: new information from the Delft archives. **Annals**
2611 **of Science**, 73,257-88, 2016. DOI: 10.1080/00033790.2015.1122837.
- 2612 ZUMA, A.A., de SOUZA, W. Histone deacetylases as targets for
2613 antitrypanosomal drugs. **Future Science OA**, 4, 37-53, 2018. DOI: 10.4155/fsoa-
2614 2018-0037.