
Giardia lamblia: **DISTRIBUIÇÃO DE MICROTÚBULOS
NO CITOESQUELETO DE TROFOZOÍTOS
E CISTOS UTILIZANDO TAXÓIDE FLUORESCENTE**

Amanda P. Frasson,¹ Patrícia B. Vieira,¹ Geraldo A. De Carli² e Tiana Tasca¹

RESUMO

Giardia lamblia é um protozoário parasito do intestino delgado, agente etiológico da giardiose, o qual apresenta um complexo citoesqueleto composto por microtúbulos. Neste estudo, a distribuição dos microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos de *G. lamblia* foi investigada por meio de um taxóide fluorescente, o FLUTAX-2 – um derivado do Taxol que se liga aos dímeros polimerizados de $\alpha\beta$ -tubulina. O efeito do metronidazol sobre o citoesqueleto do organismo também foi avaliado. FLUTAX-2 foi capaz de se ligar aos microtúbulos de trofozoítos e cistos de *G. lamblia*, tornando possível a visualização de estruturas do citoesqueleto do microrganismo, como flagelos, funis e disco adesivo. Além disso, FLUTAX-2 marcou os trofozoítos cultivados por diferentes períodos, revelando que o intervalo de 48 horas é o melhor tempo de cultivo. A incubação dos parasitos na presença de metronidazol não demonstrou alteração significativa na marcação microtubular por FLUTAX-2. Nosso grupo já apresentou a marcação pelo FLUTAX-2 em outros protozoários, *Trichomonas vaginalis*, *T. gallinae* e *Tritrichomonas foetus*, e este é o primeiro trabalho a revelar o perfil de ligação em *G. lamblia*. Os resultados contribuem para o conhecimento de aspectos biológicos e morfológicos do parasito e sugerem perspectivas para o diagnóstico laboratorial da giardiose.

DESCRITORES: FLUTAX-2, *Giardia lamblia*, citoesqueleto, Taxol

INTRODUÇÃO

Giardia lamblia (sin. *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) é um protozoário parasito do intestino delgado (Gardner & Hill, 2001) capaz de infectar diversos hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (Cacciò et

1 Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço para correspondência: Tiana Tasca, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.
E-mail: tiana.tasca@ufrgs.br

Recebido para publicação em: 20/11/2009. Revisto em: 27/1/2010. Aceito em: 5/2/2010.

al., 2005; Coklin et al., 2007; Hunter & Thompson, 2005). O ciclo de vida do microrganismo apresenta dois estágios: o trofozoíto, forma vegetativa que adere às microvilosidades intestinais e o cisto, capaz de persistir no ambiente sob diversas condições (Adam, 2001; Dawson et al., 2007). O parasito é o agente etiológico da giardiose, uma doença de elevada morbidade mundial que acomete cerca de 280 milhões de pessoas a cada ano (Savioli et al., 2006; Ali & Nozaki, 2007). A infecção é caracterizada principalmente por diarreia, má-absorção e deficiência no crescimento de crianças (Mariante et al., 2005). O tratamento quimioterápico é recomendado a todos os casos sintomáticos da doença e, frequentemente, aos portadores assintomáticos (Sandhu et al., 2004). Metronidazol (MTZ) é um dos fármacos mais comumente utilizados para o tratamento da giardiose (Sadjjadi et al., 2001). O MTZ é ativado pela redução de seu grupo nitro e, assim, liga-se ao DNA provocando perda da sua estrutura helicoidal, quebra de filamentos, comprometimento concomitante de sua função e, conseqüentemente, a morte dos trofozoítos (Samuelson, 1999; Tracy & Webster, 2003). Para mensurar a resposta *in vitro* ao fármaco, ensaios colorimétricos, metabólicos, de análise morfológica, de inibição de crescimento e de inibição da aderência têm sido empregados (Gardner & Hill, 2001).

G. lamblia é um organismo binucleado e multiflagelar que apresenta um complexo citoesqueleto composto por microtúbulos (Campanati et al., 2003). Microtúbulos são estruturas estáveis essenciais para a manutenção da forma e organização da célula, também são fundamentais no transporte citoplasmático, na motilidade e na divisão em células eucarióticas (Wilson & Jordan, 1994). O citoesqueleto deste parasito é representado, principalmente, pelos corpos basais e axonemas de oito flagelos; pelos funis, microtúbulos que acompanham os axonemas caudais; pelo corpo mediano, formado por um grupo irregular de microtúbulos e pelo disco adesivo ventral, composto por microtúbulos que se dispõem paralelamente na forma de espiral (Benchimol, 2004; Benchimol et al., 2004; Piva & Benchimol, 2004).

Pelo fato dos microtúbulos desempenharem papéis importantes na mitose, tornam-se alvos de diversos fármacos antitumorais, incluindo vimblastina, colchicina e paclitaxel (Taxol) (Jordan & Wilson, 1998). Taxol é considerado um agente estabilizador de microtúbulos: liga-se a eles, estabiliza-os e bloqueia a divisão celular (Díaz et al., 2004). Devido a este mecanismo de ação, o Taxol tem demonstrado atividade frente a um amplo espectro de neoplasias malignas, como câncer de ovário, mama, pulmão, cabeça e pescoço e sarcoma de Kaposi (Fojo & Menefee, 2007).

FLUTAX-2 é um derivado fluorescente ativo do Taxol. Esses derivados podem ser extremamente úteis em estudos sobre morfologia e mecanismos de associação e estabilização de microtúbulos (Vieira et al., 2008). FLUTAX-2 liga-se aos dímeros polimerizados de α - β tubulina, competindo com a molécula de Taxol pelo mesmo sítio de ligação. Este sítio se localiza, provavelmente, na superfície

externa dos microtúbulos, tornando-os direta e rapidamente observáveis por microscopia de fluorescência (Evangelio et al., 1998; Arregui et al., 2002). A análise microscópica da distribuição dos microtúbulos e composição do citoesqueleto, por meio do uso de FLUTAX, contribui para a compreensão de aspectos envolvidos na morfologia e comportamento celular (Lecke et al., 2003). Ela já foi realizada com células epiteliais Ptk2, células leucêmicas U937, *Trypanosoma cruzi* (Evangelio et al., 1998), *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas gallinae* e *Tritrichomonas foetus* (Lecke et al., 2002; Vieira et al., 2008).

Considerando a elevada prevalência e a severidade da giardiose, é importante estudar os aspectos biológicos e morfológicos de *G. lamblia* que contribuem para o entendimento dos mecanismos de infecção do hospedeiro e sua patogênese. O objetivo deste estudo foi investigar a distribuição dos microtúbulos no citoesqueleto de trofozoítos e cistos de *G. lamblia* utilizando um derivado fluorescente do Taxol. Além disso, o efeito do metronidazol sobre o citoesqueleto do microrganismo também foi avaliado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo in vitro dos parasitos

Os trofozoítos de *G. lamblia*, isolado WB (American Type Culture Collection 30957), foram cultivados em meio TYI-S-33 (*Trypticase*, *Yeast Extract*, *Iron Serum*), pH 7,1, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado (Diamond et al., 2002), sulfato de estreptomicina (1,0 mg/ml) e succinato de cloranfenicol (2,0 mg/ml), à 37°C. Para todos os experimentos, trofozoítos na fase logarítmica de crescimento (exibindo mais de 95% de motilidade e morfologia normal) foram coletados por centrifugação (750 x g, 5 minutos). Todos os experimentos foram realizados com três diferentes culturas ($n=3$) em triplicata.

Teste de sensibilidade in vitro ao metronidazol

Experimentos anteriores foram realizados com o objetivo de avaliar a suscetibilidade *in vitro* do isolado WB ao metronidazol. Os parasitos foram lavados três vezes com solução salina-fosfato tamponada (*Phosphate Buffer Solution*, *PBS*) e os *pellets* foram ressuspensos em meio TYI-S-33 suplementado, ajustando-se a densidade para $1,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL. Os trofozoítos foram expostos a concentrações seriadas de metronidazol (9,41 a 0,073 mM) em meio TYI-S-33, utilizando-se microplacas de 96 poços. Os controles foram preparados sem a adição do fármaco. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, então, examinadas em microscópio invertido para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do metronidazol (Tasca et al., 2003).

Tratamento in vitro com metronidazol

Parasitas foram lavados três vezes com PBS e os *pellets* foram ressuspendidos em meio TYI-S-33 suplementado, ajustando-se a densidade para $1,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL. Os trofozoítos foram expostos a CIM do metronidazol em meio TYI-S-33, utilizando-se microtubos (volume final de 500 μ L), e incubados a 37°C por 2, 4, 6, 12 e 24 horas.

Isolamento dos cistos

O isolamento dos cistos foi realizado a partir de uma amostra fecal cedida pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A amostra foi submetida à tradicional técnica de sedimentação (método de Hoffman, Pons e Janer) (De Carli, 2007). O isolamento dos cistos de *G. lamblia* seguiu o protocolo descrito por Alvarado & Wasserman (2006), com algumas modificações. O sedimento foi coletado, centrifugado (800 x g, 5 minutos) e lavado três vezes com água destilada. O *pellet* foi ressuspendido em 20 mL de água destilada e dividido em quatro alíquotas de 5 mL cada. Cada alíquota foi cuidadosamente vertida sobre 3 mL de sacarose fria 0,85 M e então centrifugada (600 x g, 10 minutos). Observou-se o aparecimento de uma película localizada na interface das fases após a centrifugação. As películas foram coletadas, reunidas e homogeneizadas para posterior experimento. O homogeneizado final foi observado microscopicamente com solução de iodo (1%) de Dobell e O'Connor (De Carli, 2007) para verificação da recuperação dos cistos.

Incubação com FLUTAX-2

A sonda 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl] Taxol (FLUTAX-2) foi obtida pela reação de 7-O-(L-alanyl)Taxol com o corante fluorescente amino-reativo correspondente, como descrito por Souto et al. (1995). FLUTAX-2 foi gentilmente cedido pelo Dr. André A. Souto (Faculdade de Química, PUCRS, Brasil). FLUTAX-2 apresenta absorvância na região UV-visível e espectro de emissão de fluorescência conforme os respectivos cromóforos (Vieira et al., 2008). Os trofozoítos cultivados por 24, 48, 72, 96 e 120 horas foram lavados três vezes com PBS e a densidade foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ trofozoítos/mL. Os trofozoítos foram incubados com FLUTAX-2 (concentração final de 1,0 μ M) por 40 minutos, a 37°C (Lecke et al., 2002). Além disso, os organismos foram incubados com FLUTAX-2 e EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (concentração final de 5,0 mM), um agente quelante utilizado para sequestrar íons Mg^{2+} . Os trofozoítos tratados com metronidazol, após o período de incubação com o fármaco, foram lavados três vezes e ressuspendidos com PBS, em seguida foram incubados com FLUTAX-2, como descrito anteriormente. Igualmente, o homogeneizado final obtido no isolamento

dos cistos também foi submetido à incubação com FLUTAX-2. Depois disso, lâminas foram preparadas com a suspensão incubada com FLUTAX-2 e mantidas em local protegido da luz até completa secagem. As lâminas foram então observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 e as imagens foram obtidas com câmera digital Nikon 1200C e *software* NIS Elements AR 230 Nikon.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

G. lamblia apresenta um complexo citoesqueleto formado principalmente por estruturas compostas de tubulinas, que estão envolvidas na locomoção da célula, na busca por substratos e na manutenção da forma celular. Os principais elementos do citoesqueleto deste parasito são seus oito flagelos, arranjados em quatro pares; o disco adesivo ventral, uma espiral microtubular responsável pela fixação do substrato; o corpo mediano, um grupo irregular de microtúbulos encontrados unicamente em células de *Giardia* que ainda tem sua função desconhecida e os funis, estruturas associadas aos axonemas caudais que parecem atuar no deslocamento da região posterior da célula (Benchimol et al., 2004; Campanati et al., 2002).

Sabendo-se que *G. lamblia* representa um dos mais antigos modelos de células eucarióticas (Adam, 2001) torna-se importante analisar e compreender a organização de seu citoesqueleto. Neste estudo, utilizou-se um derivado fluorescente do Taxol – FLUTAX-2 – para investigar a distribuição dos microtúbulos no citoesqueleto do parasito. FLUTAX-2 liga-se com alta afinidade aos dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina em um sítio de ligação que parece estar localizado na superfície externa dos microtúbulos, entre os protofilamentos. Esta localização torna o Taxol e seus derivados capazes de se ligar muito rapidamente aos seus sítios e, além disso, possibilita que os microtúbulos sejam diretamente observáveis por microscopia de fluorescência (Evangeliou et al., 1998). Os resultados obtidos por microscopia de fluorescência mostram que FLUTAX-2 é capaz de marcar as estruturas microtubulares dos trofozoítos de *G. lamblia*, permitindo a investigação dos elementos formadores do citoesqueleto do microrganismo. Imediatamente após a incubação com FLUTAX-2, foi possível observar as células fluorescentes e com motilidade dos flagelos (dados não mostrados), o que representa uma grande vantagem do método, já que os trofozoítos podem ser visualizados ainda vivos sem a necessidade de processos de fixação e permeabilização (Arregui et al., 2002). Os experimentos também demonstraram que o uso desta sonda pode ser extremamente interessante graças à estabilidade da fluorescência. As lâminas podem ser preservadas sem apresentar prejuízos em análises posteriores, desde que mantidas sob proteção da luz.

O perfil de marcação dos trofozoítos de *G. lamblia*, após diferentes tempos de crescimento, é apresentado na Figura 1. Mesmo depois de diversos períodos de incubação (24 a 120 horas), os organismos foram observados por fluorescência, mostrando que a ligação do FLUTAX-2 aos microtúbulos ocorre independentemente

do tempo de cultivo. Em 24 e 48 horas, os trofozoítos apresentaram uma marcação mais intensa. De maneira geral, em 48 horas, as estruturas do citoesqueleto foram melhor visualizadas. Após 96 e 120 horas de incubação, os parasitos mostraram um padrão de marcação menos organizado. Diversos parasitos incubados por quatro dias apresentaram fluorescência de menor intensidade (dados não mostrados), sugerindo que tempos de cultivo anteriores devem ser preferencialmente adotados. Considerando o cultivo *in vitro*, o consumo de nutrientes e a produção de metabólitos são condições essenciais para a manutenção da viabilidade celular. Quando essas condições são violadas, observam-se fenômenos de injúria celular, como autofagia e vacuolização, os quais podem ser causados por alterações no metabolismo energético e síntese de proteínas, incluindo tubulinas. Provavelmente, o padrão de marcação desorganizado nos organismos cultivados por períodos mais longos pode ser atribuído a modificações no metabolismo que podem levar ao dano celular, aqui evidenciado por meio da marcação dos microtúbulos.

O perfil de marcação dos microtúbulos dos trofozoítos de *G. lamblia* utilizando FLUTAX-2 é apresentado na Figura 1. As imagens revelam nitidamente o formato piriforme da célula. O disco adesivo, a estrutura mais característica do trofozoíto, pode ser identificada na região anterior (Figura 1 A-F). Os quatro pares de flagelos, que emergem de diferentes pontos e contribuem para a locomoção da célula, também mostram-se marcados (Figura 1 A-F). O corpo mediano (Figura 1C) é constituído de um grupo de microtúbulos fixados aos axonemas dos flagelos caudais que parece estar relacionado à progênese do disco adesivo. Esta estrutura não é facilmente observada nos trofozoítos e algumas hipóteses tentam explicar este comportamento morfológico: o corpo mediano pode assumir uma posição vertical e ser ocultado pelos axonemas da região caudal, ou por ser tão pequeno pode não ser visto facilmente, ou, ainda, há a possibilidade de ele estar ausente em alguns trofozoítos (Piva & Benchimol, 2004). Os funis aparecem fortemente marcados nas imagens (Figura 1 A-C, E-F). Essas estruturas seguem os axonemas desde a região internuclear até a emergência dos flagelos caudais. Além disso, fica nítido nas imagens que o citoplasma da célula também foi corado pelo FLUTAX-2. Adicionalmente, na Figura 1-F, pode-se observar um trofozoíto em divisão celular. Essa divisão ocorre claramente em simetria bilateral; a microfotografia mostra que os trofozoítos são binucleados e estão em processo de divisão do citoplasma. Campanati et al. (2003) mostraram a distribuição de α -tubulina e β -tubulina no disco adesivo ventral, no corpo mediano, nos funis e nos flagelos de *G. lamblia* utilizando anticorpos específicos. Considerando que FLUTAX-2 se liga aos dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os dados apresentados por aqueles autores.

O alongamento dos microtúbulos induzido pelo FLUTAX-2 é dependente de Mg^{2+} e o espectro de absorção da ligação é sensível às concentrações do cátion (Evangelio et al., 1996). Neste estudo, nós testamos o efeito do EDTA para verificar sua ação quelante sobre a ligação do FLUTAX-2. Os trofozoítos, mesmo após

incubação com EDTA, apresentaram marcação; no entanto, a fluorescência obtida foi de menor intensidade (Figura 2). Este resultado confirma a importância do magnésio na ligação do FLUTAX-2, mesmo na presença do EDTA. Os trofozoítos foram corados na presença do quelante provavelmente porque o magnésio é o cátion divalente mais abundante nas células, atingindo concentrações celulares entre 14 e 20 mM (Schmitz et al., 2007). Desse modo, o EDTA foi incapaz de sequestrar todo o Mg^{2+} presente nos parasitos intactos.

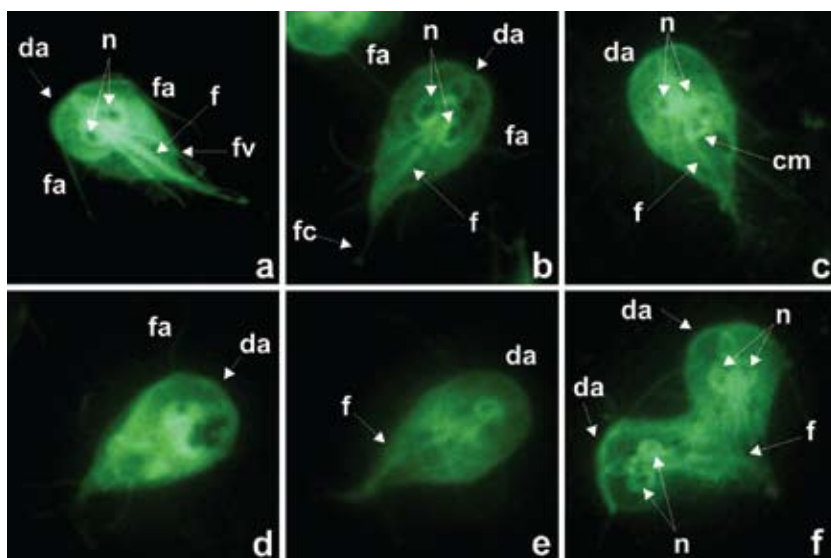


Figura 1. Visualização dos microtúbulos marcados com FLUTAX-2 nos trofozoítos de *G. lamblia*. As imagens mostram os trofozoítos após 24 horas (Fig. 1A), 48 horas (Fig. 1B), 72 horas (Fig. 1C), 96 horas (Fig. 1D) e 120 horas (Fig. 1E) de crescimento. Fig. 1F mostra um trofozoítos de *G. lamblia* em divisão celular. DA indica disco adesivo; FA, flagelo anterior; FC, flagelo caudal; FV, flagelo ventral; F, funis; CM, corpo mediano, e N, núcleo. Ampliação original 1.000x.

Metronidazol e outros 5-nitroimidazólicos são seletivamente tóxicos à *Giardia*. Entretanto, o mecanismo de ação desses fármacos sobre este parasito não está bem elucidado. Por analogia à atividade antimicrobiana destes compostos contra bactérias e *Trichomonas*, tem sido proposto que os efeitos de citotoxicidade se devem aos radicais livres nitro que são formados durante a redução do fármaco (Sousa & Silva, 1999). Os elétrons são transferidos para o grupo nitro pela proteína ferredoxina. O metronidazol reduzido torna-se então, um aceptor de elétrons que se liga ao DNA provocando a quebra dos filamentos e a subsequente morte da célula

(Gardner & Hill, 2001). Em razão da grande importância clínica deste fármaco no tratamento da infecção, torna-se interessante conhecer a suscetibilidade dos trofozoítos de *G. lamblia* frente ao metronidazol. Os resultados obtidos no teste de sensibilidade *in vitro* ao metronidazol demonstraram que o isolado de WB é sensível ao fármaco, apresentando CIM igual a 0,147 mM. Estudos apontam valores de IC₅₀ (do inglês, *Inhibitory Concentration*₅₀) para o metronidazol variando entre 2,25 µM (Bénére et al., 2007), 4,27 µM (Cruz et al., 2003) e 0,35 mM (Sousa & Silva, 1999). Outros trabalhos indicam CIM do fármaco entre 5,88 µM e 294 µM (Jokipii & Jokipii, 1980), revelando uma grande variação nos resultados encontrados, provavelmente devido ao uso de diferentes isolados e condições de experimentação.

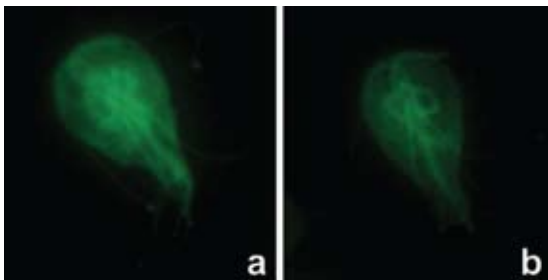


Figura 2. Visualização dos microtúbulos marcados com FLUTAX-2 nos trofozoítos de *G. lamblia*, após incubação com 5,0 mM de EDTA. Ampliação original 1.000x.

As imagens do tratamento *in vitro* com metronidazol estão representadas na Figura 3. A Figura 3-A mostra um trofozoíto no tempo zero de incubação, seguido pelos tempos de 2, 4, 6, 12 e 24 horas (Figura 3B, C, D, E, e F, respectivamente). Pelas microfotografias, percebe-se que a intensidade de fluorescência é maior no tempo zero quando comparada aos demais períodos de tratamento. Além disso, no período de 24 horas (Figura 3-F), as estruturas do citoesqueleto do trofozoíto não aparecem claramente definidas e o trofozoíto apresenta-se em formato arredondado. No entanto, apesar de algumas pequenas modificações observadas por microscopia de fluorescência no maior período de incubação com o fármaco, os resultados obtidos mostram que o metronidazol não afeta as estruturas do citoesqueleto de *G. lamblia* compostas por microtúbulos.

Neste estudo, os cistos foram isolados diretamente de uma amostra fecal e demonstraram fluorescência logo após incubação com FLUTAX-2. Na Figura 4, observa-se o cisto com seu formato oval característico. Embora os cistos de *G. lamblia* sejam tetranucleados, é possível observar a presença de dois núcleos e de uma estrutura composta pelos axonemas dos flagelos, demonstrando assim, que FLUTAX-2 foi capaz de permear a rígida parede cística. Considerando a

amostra fecal, além dos cistos, algumas estruturas apresentam fluorescência, como mostrado na Figura 4, onde uma levedura pode ser observada. No entanto, o fato de outras estruturas tornarem-se fluorescentes não representa uma desvantagem do método, pois a morfologia dos cistos é facilmente distinguível. Estes resultados são significantes, indicando perspectivas de estudo para o desenvolvimento de um novo método para o diagnóstico laboratorial da giardiose.

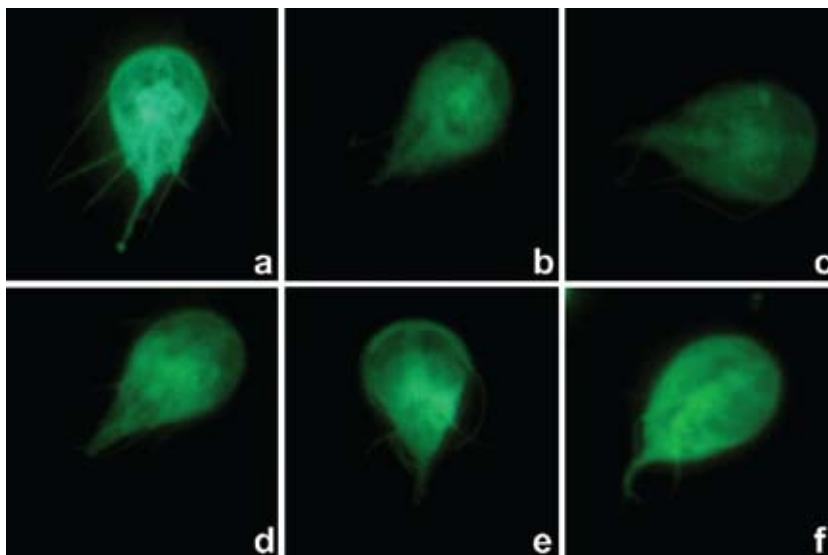


Figura 3. Visualização dos microtúbulos marcados com FLUTAX-2 nos trofozoítos de *G. lamblia*, após incubação com metronidazol. As imagens mostram os trofozoítos nos tempos zero (Fig. 3A), 2 horas (Fig. 3B), 4 horas (Fig. 3C), 6 horas (Fig. 3D), 12 horas (Fig. 3E) e 24 horas (Fig. 3F) de tratamento com o fármaco. Ampliação original 1.000x.

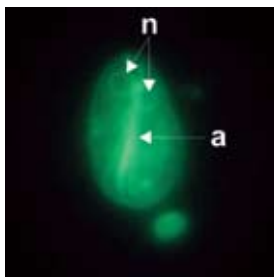


Figura 4. Visualização dos microtúbulos marcados com FLUTAX-2 nos cistos de *G. lamblia*. N indica núcleo; A, axonemas. Uma levedura é observada abaixo da estrutura cística. Ampliação original 1.000x.

No presente estudo, um derivado fluorescente do Taxol foi empregado para investigação da distribuição dos microtúbulos no citoesqueleto de *G. lamblia* e, conseqüentemente, a identificação de trofozoítos e cistos. As principais vantagens da utilização do FLUTAX-2 incluem a rapidez, eficácia e facilidade do método (Arregui et al., 2002). Além disso, a utilização dessa sonda pode ser interessante para identificação e diferenciação de espécies de protozoários (Vieira et al., 2008; Lecke et al., 2002). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a constituição do citoesqueleto deste parasito pode ser pesquisada com o uso de FLUTAX-2, e que o metronidazol, fármaco importante no tratamento da giardiose, atua por mecanismos que não afetam o citoesqueleto do microrganismo. Assim, os dados são importantes para o entendimento do modo de ação dos nitroimidazóis e indicam perspectivas para desenvolvimento de um novo método diagnóstico para giardiose. Além disso, os resultados contribuem para o entendimento da infecção e patogênese da doença, uma vez que incrementam o conhecimento dos aspectos biológicos e morfológicos de *G. lamblia*.

AGRADECIMENTOS

À Dr. Lisiane Porciúncula e Dr. Fátima Guma, Departamento de Bioquímica, UFRGS, pelo auxílio com o microscópio de fluorescência e à Luana P. Frasson, pela edição das figuras. Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS, Brasil), #0522751 e TWAS (Itália), # 06-328.

ABSTRACT

Giardia lamblia: distribution of microtubules on the cytoskeleton of trophozoites and cysts by use of fluorescent taxoid

G. lamblia is a protozoan parasite of the small intestine and the etiologic agent of giardiasis, which presents a complex cytoskeleton composed of microtubules. In this study, the microtubule cytoskeleton was labeled in trophozoites and cysts of *G. lamblia*, using a fluorescent taxoid (FLUTAX-2), a derivative of Taxol, which binds to $\alpha\beta$ -tubulin dimer polymerized. In addition, the effect of metronidazole on the cytoskeleton of the parasite was also evaluated. FLUTAX-2 was able to label the microtubules of trophozoites and cysts, allowing the observation of cytoskeletal structures, such as flagella, funis, adhesive disk, and median body. Moreover, FLUTAX-2 labeled the trophozoites from several different cultivation times, revealing the 48 hours as the best incubation period. The incubation of parasites in presence of metronidazole did not show significant alteration on the microtubule labeling by FLUTAX-2. We have shown the FLUTAX-2 labeling in other protozoa, *Trichomonas vaginalis*, *T. gallinae* and *Tritrichomonas foetus*, and this is the first report revealing the binding profile in *G. lamblia*. Our results contribute to the knowledge of biological and morphological features of this intestinal pathogen.

Furthermore, our data showed no modification of microtubule profile labeling in presence of metronidazole. Finally, a new perspective for giardiasis diagnostic is suggested, since trophozoites and cysts of *G. lamblia* were labeled with FLUTAX-2.

KEY WORDS: FLUTAX-2. *Giardia lamblia*. Microtubule. Taxol.

REFERÊNCIAS

1. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-475, 2001.
2. Ali V, Nozaki T. Current Therapeutics, Their Problems, and Sulfur-Containing-Amino-Acid Metabolism as a Novel Target against Infections by “Amitochondriate” Protozoan Parasites. *Clin Microbiol Rev* 20: 164-187, 2007.
3. Alvarado ME, Wasserman M. Quick and efficient purification of *Giardia intestinalis* cysts from fecal samples. *Parasitol Res* 99: 300-302, 2006.
4. Arregui L, Muñoz-Fontela C, Serrano S, Barasoain L, Guinea A. Direct visualization of the microtubular cytoskeleton of ciliated protozoa with a fluorescent taxoid. *J Eukaryot Microbiol* 49: 312-318, 2002.
5. Benchimol M. Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. *Biol Cell* 96: 291-301, 2004.
6. Benchimol M, Piva B, Campanati L, de Souza W. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *J Struct Biol* 147: 102-115, 2004.
7. Bénéré E, Da Luz RAI, Vermeersch M, Cós P, Maes L. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods* 71: 101-106, 2007.
8. Cacciò SM, Thompson A, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-437, 2005.
9. Campanati L, Holloschi A, Tröester H, Spring H, De Souza W, Monteiro-Leal LH. Video-microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoon *Giardia lamblia*. *Cell Motil Cytoskeleton* 51: 213-224, 2002.
10. Campanati L, Troester H, Monteiro-Leal LH, Spring H, Trendelenburg MF, Souza W. Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Histochem Cell Biol* 119: 323-331, 2003.
11. Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 150: 297-305, 2007.
12. Cruz A, Sousa MI, Azaredo Z, Leite E, De Sousa JCF, Cabral M. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: *in vitro* susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother* 51: 1017-1020, 2003.
13. Dawson SC, Sagolla MS, Mancuso JJ, Woessner DJ, House SA, Fritz-Laylin L, Cande WZ. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell* 6: 2354-2364, 2007.
14. De Carli GA. *Exames Macroscópico e Microscópico da Amostra Fecal Fresca e Preservada*. In: GA De Carli (ed) *Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*, 2ª ed. Atheneu. São Paulo, 2007.
15. Diamond LS, Clark CG. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin Microbiol Rev* 15: 329-341, 2002.
16. Díaz JF, Barasoain I, Souto AA, Amat-Guerri F, Andreu JM. Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. *J Biol Chem* 280: 3928-3937, 2004.

17. Evangelio JA, Abal M, Barasoain I, Souto AA, Lillo MP, Acuña AU, Amant-Guerri F, Andreu JM. Fluorescent taxoids as probes of the microtubules cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 39: 73-90, 1998.
18. Fojo T, Menefee M. Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents. *Ann Oncol* 18: v3-v8, 2007.
19. Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 14: 124-128, 2001.
20. Hunter PR, Thompson RCA. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol* 35: 1181-1190, 2005.
21. Jokipii L, Jokippi AM. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to metronidazole and tinidazole. *J Infect Dis* 141: 317-325, 1980.
22. Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 10: 123-130, 1998.
23. Lecke SB, Tasca T, Souto AA, De Carli GA. *Trichomonas vaginalis*: microtubule cytoskeleton distribution using fluorescent taxoid. *Exp Parasitol* 102: 113-116, 2002.
24. Lecke SB, Tasca T, Souto AA, De Carli GA. Perspective of a new diagnostic for human trichomonosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 273-276, 2003.
25. Mariante RM, Vancini RG, Melo AL, Benchimol M. *Giardia lamblia*: Evaluation of the *in vitro* effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Exp Parasitol* 110: 62-72, 2005.
26. Piva B, Benchimol M. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell* 96: 735-746, 2004.
27. Sadjjadi SM, Alborzi AW, Mostovfi H. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. *J Trop Pediatric* 47: 176-178, 2001.
28. Samuelson J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1533-1541, 1999.
29. Sandhu H, Mahajan RC, Ganguly NK. Flowcytometric assessment of the effect of drugs on *Giardia lamblia* trophozoites *in vitro*. *Mol Cell Biochem* 265: 151-160, 2004.
30. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22: 203-208, 2006.
31. Schmitz C, Deason F, Perraud AL. Molecular components of vertebrate Mg²⁺-homeostasis regulation. *Magnes Res* 20: 6-18, 2007.
32. Sousa MC, Silva P. A new method for assessing metronidazole susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2939-2942, 1999.
33. Souto AA, Acuña AU, Andreu JM, Barasoain I, Abal M, Anat-Guerri F. New fluorescent water-soluble Taxol derivatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 34: 2710-2712, 1995.
34. Tasca T, Borges FP, Bonan CD, De Carli GA, Battastini AM, Sarkis JJ. Effects of metronidazole and tinidazole on NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase from intact cells of *Trichomonas vaginalis*. *FEMS Microbiol Lett* 226: 379-384, 2003.
35. Tracy JW, Webster LT. *Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários*. In: JG Hardman, LE Limbird, AG Gilman (eds) Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10ª ed. Mc Graw Hill. Rio de Janeiro, 2003.
36. Vieira PB, Borges FP, Gottardi B, Stuepp C, Larré AB, Tasca T, De Carli GA. Analysis of microtubule cytoskeleton distribution using a fluorescent taxoid in two trichomonadid protozoa: *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus*. *Exp Parasitol* 119: 186-191, 2008.
37. Wilson L, Jordan MA. *Pharmacological probes of microtubule function*. In: JS Hyams, CW Lloy (eds) Microtubules, 2ª ed. Wiley-Liss. New York, 1994.