

00346 15
24j



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"ANALISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE
TROFOZOITOS DE CEPAS Y CLONAS DE *Giardia*
lamblia Y SU RELACION CON ADHESION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

GUADALUPE BEATRIZ RODRIGUEZ FUENTES



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CD. UNIVERSITARIA

1998

221297



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Numeração
Descontinua

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. En colaboración con el Departamento de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I. P. N. Bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia, del Dr. Roberto Manuel Cedillo Rivera y de la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres, a quienes extiendo mi más profundo y sincero agradecimiento.

Para obtener el grado de Maestría, el Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología me otorgó una beca con el registro No. 69143, durante el período de abril 1995 a febrero de 1997, por lo que expreso mi agradecimiento.

Asimismo, este trabajo recibió financiamiento económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto con No. de registro 4315P- M9608.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Lilián Yépez Mulia**, por su constante asesoría y entusiasmo en la realización de este proyecto, por los innumerables conocimientos legados, los cuales me sirvieron como motivación. Así como por el apoyo académico que nunca ha escatimado.

Al **Dr. Roberto M. Cedillo Rivera**, por su gran cooperación y valiosos consejos para el desarrollo de este trabajo y por permitirme trabajar en su laboratorio. Así como por su apoyo moral en momentos difíciles.

A la **Dra. Guadalupe Ortega-Pierres**, por la gran cantidad de conocimientos y sugerencias aportadas a este trabajo, además del gran interés mostrado en el desarrollo del mismo. De manera especial, agradezco el haberme permitido realizar parte de los experimentos en su laboratorio e integrarme a su grupo de trabajo, lo cual fue muy importante en mi formación.

A la **Bióloga Rocío Fonseca**, por su constante ayuda, experiencia y adiestramiento brindado, ya que el tiempo que le dedicó a este trabajo es invaluable, así como por los gratos momentos que compartimos.

Al **Dr. Homero Hernández**, quien con su gran experiencia dentro de este campo, aportó valiosas sugerencias y cuya participación fue de suma importancia.

A la **Dra. Bertha Espinoza**, a la **M. en C. Lilia Amelia** y al **M. en C. Raúl Argüello**, ya que el interés mostrado para la revisión de esta tesis y los comentarios aportados fueron mucha importancia para concluir este trabajo.

A **Amparo ("hijina")** y a **Oscar**, ya que han sido amigos en toda la extensión de la palabra y han contribuido de manera importante para que yo salga adelante, y principalmente, Amparo, quien me ha escuchado y me ha ayudado desinteresadamente, ya que su presencia ha sido valiosa tanto emocional como laboralmente.

A mis compañeros del laboratorio de Parasitología, ya que de una u otra forma con sus comentarios han contribuído tanto en la realización y culminación de este trabajo, así como a mi formación.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 2 del CINVESTAV: Arturo, Fernando, Raúl, Rocío, Patricia, Maricela, Blanca y el Sr. René, ya que con su calidez hicieron más agradable mi estancia en su laboratorio.

DEDICATORIAS

A Víctor : ya que este es el resultado de un proyecto en el que trabajamos juntos día con día, y que gracias a tu apoyo y cariño he logrado concluir.

A mis padres: porque con sus enseñanzas, apoyo y amor incondicionales han contribuido en gran medida en todos mis logros.

A todos mis amigos y familiares: los cuales siempre han puesto un granito de arena en mi desarrollo como persona y como profesionista.

INDICE

INDICE	i
ABREVIATURAS UTILIZADAS	v
RELACION DE TABLAS	vi
RELACION DE FIGURAS	vii
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCION	
• Taxonomía, sistemática y nomenclatura	1
• Ciclo de vida	3
• Características clínicas	6
• Epidemiología	7
• Mecanismos de patogenia de la giardiosis	8
• Proteasas. Generalidades	17
• Nomenclatura	18
• Clasificación y Mecanismo	19
• Cisteína-proteasas	20
• Serina-proteasas	21
• Aspártico-proteasas	22
• Metallo-proteasas	23

• Actividad de proteasas en parásitos y su relación con la patogenicidad.	25
II. OBJETIVOS	
• Objetivo general	35
• Objetivos particulares	35
III. MATERIALES Y METODOS	
1.- Parásitos.	36
2.- Obtención de extractos solubles de trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7.	36
3.- Determinación de actividad y los tipos de proteasas presentes en extractos solubles de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> empleando un método colorimétrico.	37
4.- Caracterización de la actividad proteolítica en los extractos solubles de <i>G. lamblia</i> empleando geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina.	38
5.- Análisis densitométrico.	39
6.- Determinación de la viabilidad y de la actividad metabólica de la cepa WB y de las clonas C5 y C7.	39
7.- Cultivo de células epiteliales MDCK e IEC-6.	40

8.- Ensayo de adhesión de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> a células epiteliales MDCK e IEC-6.	41
9.- Determinación de la actividad de proteasas en sobrenadantes de cultivos de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> después de la interacción con células MDCK e IEC-6.	42

IV. RESULTADOS

• Análisis electroforético de los extractos solubles de la cepa WB y de las clonas C5 y C7.	43
• Estandarización de las condiciones del método colorimétrico empleando azocaseína como sustrato.	44
-Estandarización de la cantidad de proteína.	44
- Valor óptimo de pH.	45
• Determinación de la actividad proteolítica en extractos solubles de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> empleando un método colorimétrico	47
• Caracterización de la actividad proteolítica de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> mediante geles PAGE-SDS copolimerizados con gelatina.	51
• Determinación del efecto de los inhibidores de proteasas la viabilidad y de la actividad metabólica de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7.	61

• Ensayo de inhibición de la adhesión de trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de <i>G. lamblia</i> a las líneas celulares MDCK e IEC-6.	72
• Determinación de la actividad de proteasas en sobrenadantes de cultivos de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> después de la interacción con células MDCK e IEC-6.	78
V. DISCUSION.	80
VI. CONCLUSIONES	94
APENDICE A	96
APENDICE B	97
APENDICE C	99
APENDICE D	100
VII. BIBLIOGRAFIA	101

ABREVIATURAS

ASF	Amortiguador Salino de Fosfatos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.
E-64	Trans-epoxi-succinil-L-leucilamido-[4-guanidino]butano
IAA	Iodoacetamida
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
TPCK	L-1-cloro-3(4-tosilamido)4-fenil-2-butanona-tosil fenilalanil-clorometilcetona
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
MTT	Bromuro de 4,5 dimetiltiazol-2,5 difeniltetrazolio
PMS	Metasulfato de fenazina
MDCK	Células epiteliales de riñón de perro
IEC-6	Células epiteliales de íleon de rata
D-MEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
D-MEM-Hyb	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco para hibridomas
PPO	2, 5 Difeniloxazol
POPOP	p-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benceno
cpm	cuentas por minuto
μCi	MiliCurie
SN	Sobrenadante
UI	Unidades Internacionales

RELACION DE TABLAS

- TABLA 1. Determinación de la actividad proteolítica (%) en extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas 49**
- TABLA 2. Determinación de la actividad proteolítica de extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas 50**
- TABLA 3. Análisis densitométrico de la inhibición (%) de la actividad proteolítica de los extractos solubles de la cepa WB en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. 54**
- TABLA 4. Análisis densitométrico de la inhibición (%) de la actividad proteolítica de los extractos solubles de la cepa C5 en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. 57**
- TABLA 5. Análisis densitométrico de la inhibición (%) de la actividad proteolítica de los extractos solubles de la cepa C7 en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. 60**

RELACION DE FIGURAS

- FIGURA 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. 5**
- FIGURA 2. Análisis electroforético de los extractos solubles obtenidos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7. 43**
- FIGURA 3. Valores de densidad óptica obtenidos empleando un método colorimétrico con azocaseína como sustrato. 44**
- FIGURA 4. Valores de densidad óptica obtenidos empleando un método colorimétrico con azocaseína como sustrato a diferentes valores de pH. 45**
- FIGURA 5. Valores de densidad óptica obtenidos empleando un método colorimétrico con azocaseína a diferentes valores de pH en ausencia de EDTA y cisteína. 46**
- FIGURA 6. Análisis electroforético del extracto soluble de trofozoítos de la cepa WB de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. 53**

FIGURA 7. Análisis electroforético del extracto soluble de trofozoítos de la clona C5 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. 56

FIGURA 8. Análisis electroforético del extracto soluble de trofozoítos de la clona C7 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. 59

FIGURA 9. Determinación de la inhibición de la viabilidad de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de E-64 e IAA. 63

FIGURA 10. Determinación de la inhibición de la viabilidad de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de PMSF y TPCK. 64

FIGURA 11. Determinación de la inhibición de la viabilidad de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de 1,10 ph y EDTA. 65

- FIGURA 12. Determinación de la inhibición de la actividad metabólica de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de los inhibidores E-64 e IAA. 67**
- FIGURA 13. Determinación de la inhibición de la actividad metabólica de trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G.lamblia* en presencia de los inhibidores PMSF y TPCK. 69**
- FIGURA 14. Determinación de la inhibición de la actividad metabólica de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de los inhibidores 1,10 ph y EDTA. 71**
- FIGURA 15. Microfotografía de las líneas celulares IEC-6 y MDCK. 73**
- FIGURA 16. Microfotografía de la interacción de las líneas celulares IEC-6 y MDCK con trofozoítos de la clona C5. 74**
- FIGURA 17. Valores de inhibición de la citoadherencia de los trofozoítos de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* a la línea celular IEC-6 empleando inhibidores de proteasas. 76**

FIGURA 18. Valores de inhibición de la citoadherencia de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* a la línea celular MDCK empleando inhibidores de proteasas.

77

FIGURA 19. Análisis electroforético de los sobrenadantes de interacción de los trofozoítos de la cepa WB y la clona C7 de *G. lamblia* con las líneas celulares IEC-6 y MDCK.

79

RESUMEN

El estudio del papel de las proteasas de *Giardia lamblia* ha sido relevante en los últimos años, ya que se ha sugerido que la actividad proteolítica puede tener un papel importante en los mecanismos de patogenicidad del parásito. A la fecha, existen varios estudios relacionados con la caracterización de las proteasas de *G. lamblia*, sin embargo, hasta ahora no se ha investigado la participación de estas en el proceso de adhesión del parásito a células epiteliales.

En el presente trabajo, se caracterizó la actividad proteolítica de la cepa WB y las clonas C5 y C7 (deficiente en adhesión) de *G. lamblia* mediante el empleo de diferentes inhibidores específicos de proteasas; además se evaluó la relación existente entre las proteasas del parásito y el proceso de adhesión. Inicialmente, se determinó la actividad proteolítica de extractos solubles de la cepa WB y de las clonas C5 y C7, mediante un método colorimétrico empleando como sustrato azocaseína. En este análisis se evidenció que tanto la cepa WB como las clonas C5 y C7 presentan actividad de proteasas principalmente de tipo cisteína, serina y metalo, observándose diferencias entre la cepa y las clonas.

Por otro lado, las proteasas de la cepa WB y de las dos clonas se caracterizaron mediante el análisis electroforético en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina, revelándose en la cepa WB y la clona C5 la presencia de 7 bandas con actividad proteolítica entre 19-160 y 19-180 kDa, respectivamente. En relación con la clona C7, se observó la presencia de 4 bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares entre 80-126 kDa. El análisis densitométrico de estos geles demostró que algunos inhibidores afectaron completamente la actividad proteolítica de varias bandas y otros solamente indujeron la disminución en la intensidad de éstas. En el caso de la cepa WB, se determinó que, la banda de actividad proteolítica de 160 kDa es de tipo cisteína y las bandas de 95, 100 y 110 kDa posiblemente de tipo serina. Con respecto a las clonas C5 y C7 se determinó que las bandas con actividad proteolítica detectadas son principalmente proteasas de tipo cisteína.

Para estudiar la participación de las proteasas de *G. lamblia* en el proceso de adhesión a células epiteliales, se procedió inicialmente a determinar la concentración de los inhibidores de proteasas que no afectara la viabilidad y actividad metabólica del parásito más del 20%. Un aspecto interesante que se observó en estas determinaciones, consistió en la mayor susceptibilidad de la cepa WB y la clona C5 a los inhibidores E-64 y TPCK así como la menor susceptibilidad de la clona C7 a los mismos inhibidores.

En los ensayos de adhesión de los trofozoítos de la cepa WB y de la clona C5 a las líneas celulares MDCK e IEC-6, en presencia de los inhibidores de proteasas, se obtuvieron porcentajes de inhibición de la adhesión entre 30 y 48%. En el caso de la clona C7, la adhesión fue afectada por los inhibidores empleados del 4 al 12%. No se observaron diferencias importantes al emplear

las dos líneas celulares. Estos resultados sugieren la participación de las proteasas en el proceso de adhesión del parásito.

Además, en este estudio se analizó la actividad proteolítica de los sobrenadantes de interacción de la cepa WB con la línea celular IEC-6. En este análisis se reveló la presencia de nueve bandas de actividad con pesos moleculares de 19, 22, 64, 90, 102, 125, 127, 139 y 160 kDa y de siete bandas con actividad proteolítica de 19, 22, 64, 90, 102, 125 y 127 kDa en el sobrenadante de trofozoítos de la cepa WB cultivados solos. Cuando el medio D-MEM utilizado en estos ensayos se concentró, no se detectó actividad proteolítica, así como tampoco en el medio D-MEM de la incubación con la línea celular IEC-6. Con respecto a los sobrenadantes de los trofozoítos de la clona C7 cultivados solos, se detectó la presencia de dos proteasas con pesos moleculares de 90 y 137 kDa. En el sobrenadante de interacción de esta clona con la línea IEC-6, se detectaron las mismas bandas de actividad proteolítica.

Asimismo, se analizó la actividad proteolítica en el sobrenadante de interacción de la cepa WB con la línea celular MDCK, detectándose la presencia de 6 bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares de 22, 64, 90, 125, 127 y 172 kDa. Cuando se concentró el medio D-MEM en donde se incubó la línea celular MDCK, se detectó una banda con actividad proteolítica y peso molecular de 172 kDa.

En términos generales, los resultados obtenidos en los ensayos de citoadherencia de los trofozoítos de *G. lamblia* a las líneas celulares IEC-6 y MDCK, sugieren la participación de las proteasas del parásito en la adhesión a células epiteliales, y que la interacción de los trofozoítos de la cepa WB con la línea celular IEC-6 estimula la secreción de proteasas, no siendo así con la clona C7. Sin embargo, se requieren estudios posteriores que permitan caracterizar en detalle el tipo de proteasa(s) secretadas por el parásito y su papel potencial en la adhesión de éste, contribuyendo así a un mejor conocimiento de este proceso.

I. INTRODUCCION

Las infecciones intestinales ocasionadas por protozoarios, se encuentran entre las más comunes en humanos en todo el mundo, ocurren tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Farthing, 1989; Adam, 1991). Entre ellas se encuentra la giardiosis, producida por el protozoo flagelado *Giardia lamblia*, cuyo hábitat natural es la parte proximal del intestino delgado. La infección puede cursar de manera asintomática o bien producir alteraciones como diarrea aguda o crónica y ocasionalmente síndrome de absorción intestinal deficiente. Esta parasitosis es particularmente común en niños, aún cuando afecta a individuos de todas las edades (Wolfe, 1992).

• TAXONOMÍA, SISTEMÁTICA Y NOMENCLATURA.

Según la clasificación más reciente, el género *Giardia* está incluido en el subphylum Sarcomastigófora (locomoción por flagelos, pseudópodos o ambos), en la superclase Mastigófora (locomoción por flagelos), clase Zoomastigófora (cloroplastos ausentes) y orden Diplomonadida (organelos duplicados). Kunstler en 1882 propuso el nombre del género *Giardia*, sin embargo en 1888 Blanchard llama al género *Lamblia*, en honor a Czech Wilem Lambl quien redescubre y redescrive a estos organismos en 1859. Un cuarto de siglo más tarde, se reconoció que los nombres del género *Giardia* y *Lamblia* eran sinónimos. Hasta la mitad de este siglo fue común asignar nombres de especies al género *Giardia* en base a la especificidad del hospedero y de las dimensiones del parásito. Usando este criterio, fueron descritas más de 40 especies de *Giardia*, sin embargo, cuando el organismo es removido del hospedero no puede ser diferenciado de otros de diferentes especies animales. Debido a esta limitante Frances Filice, en 1952, propuso que la clasificación esté basada en la diferenciación en la forma de los cuerpos medios y en el tamaño y forma del

cuerpo. Así, Filice propone reducir el número total de especies de *Giardia* a tres, que son:

a) *Giardia agilis*, presenta trofozoítos delgados y largos (20 x 4.5 μm) y cuerpos medios arreglados en paralelo al eje central del cuerpo y se ha descrito únicamente en anfibios y peces.

b) *Giardia muris*, son trofozoítos ovales con dos cuerpos medios pequeños en el centro del cuerpo, ha sido encontrado en roedores, aves y reptiles.

c) *Giardia duodenalis* (*G. intestinalis* o *G. lamblia*), distinguida principalmente por cuerpos medios que parecen la garra de un martillo acomodados transversalmente en el cuerpo y que usualmente son dobles aunque en algunas ocasiones sólo hay uno. El promedio de tamaño de esta especie a partir de diferentes hospederos es de 11-16 μm de largo y de entre 5-9 μm de ancho. Esta especie ha sido encontrada en una gran variedad de mamíferos hospederos, los que incluyen al hombre, roedores, reptiles y algunas aves (Meyer, 1990).

Cabe mencionar que existen otras clasificaciones de las especies de *Giardia* en función de otras características morfológicas. Así, existe la especie *G. psittaci* clasificada en función de la forma del cuerpo medio (garra de martillo) y por la presencia de un flanco ventrolateral incompleto así como la carencia de zurco. Por otro lado, la especie que se aisló de la garza azul y morfológicamente distinta a otras especies, se le llamó *G. ardae*. Su cuerpo medio es similar al de *G. muris* y *G. lamblia*, pero por su disco ventral y la presencia de un sólo flagelo caudal es más parecida a *G. muris* (Adam, 1991).

• CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida de *Giardia* es relativamente sencillo, presentando dos formas: el trofozoíto y el quiste. Los trofozoítos son piriformes de entre 12-14 μm de largo y entre 5-8 μm de ancho, presentan una superficie dorsal convexa y una superficie ventral plana en donde se encuentra el disco adhesivo característico de este género. Cada uno de los trofozoítos presenta dos núcleos, cuatro pares de flagelos, los que se encuentran dispuestos en simetría bilateral, y dependiendo de la especie, se encuentran uno o dos cuerpos medios, carecen de mitocondrias y aparato de Golgi. Los trofozoítos de *Giardia* se alimentan por pinocitosis y se han descrito numerosas vacuolas digestivas cerca de la superficie dorsal (Kulda y Nohynkova, 1978).

El quiste es la forma infectiva del parásito; presenta una morfología elíptica y mide aproximadamente de 6 a 10 μm de largo, dependiendo de la madurez del quiste se pueden identificar de dos a cuatro núcleos. Este se encuentra rodeado por una pared de 0.3 μm de grosor, la cual está compuesta principalmente de proteínas y azúcares. Luján y cols. (1995a), identificaron una proteína de la pared del quiste de 26 kDa, denominada CWP1. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales contra antígenos de la pared del quiste, se clonó también el gen que codifica para otra proteína de la pared del quiste, nombrada CWP2. Se observó que durante el proceso de enquistamiento la expresión de ambas proteínas tienen cinéticas idénticas, combinándose para formar un complejo estable el cual es localizado en los gránulos secretorios específicos de enquistamiento antes de su incorporación en la pared del quiste. Ambas proteínas contienen 5 copias en tandem de repeticiones ricas en leucina de 24 residuos, las cuales están implicadas en las interacciones proteína-proteína.

Macechko y cols. (1992) describieron una vía relacionada con el proceso de enquistamiento para la biosíntesis de N-acetilgalactosamina, incluyendo la epimerización de UDP-N Acetilglucosamina a UDP-N-Acetilgalactosamina, la cual es una reacción reversible. Recientemente, Das y Gillin (1996) reportaron actividades de dos transferasas en trofozoítos enquistados y basados en estos estudios puede mencionarse que N-acetilgalactosamina *in vivo* se encuentra estrechamente incorporada en los componentes estructurales de la pared fibrosa del quiste, mientras que la N-Acetilglucosamina puede encontrarse principalmente adicionada a proteínas. NAcGal es crucial para la consistencia y grosor de la pared del quiste, mientras que los componentes glucoproteicos que contienen N-acetilglucosamina son requeridos para transducción de señales necesarias para el proceso de desenquistamiento. Estos estudios en conjunto, demuestran la presencia tanto de N-acetilgalactosamina como de N-acetilglucosamina en la pared del quiste y no sólo la presencia de la primera hexosa como se reportó inicialmente.

El ciclo de vida de *G. lamblia* se inicia cuando un hospedero susceptible ingiere el quiste, el cual es inducido a desenquistarse y debido a factores como el pH ácido del estómago, se lleva a cabo el desenquistamiento en el intestino delgado del hospedero. Este proceso termina con la apertura del quiste por un extremo y la salida de los trofozoítos. Posteriormente, el proceso de fisión binaria se lleva a cabo repetidamente durante el cual los trofozoítos se despegan del epitelio intestinal y posteriormente se transforman en quiste. Con el proceso de enquistamiento, el trofozoíto binucleado llega a ser un quiste binucleado. Posteriormente cada uno de estos dos núcleos lleva a cabo una única división, dando como resultado un quiste tetranucleado, el cual es excretado y de esta forma el ciclo de vida se completa (Figura 1).

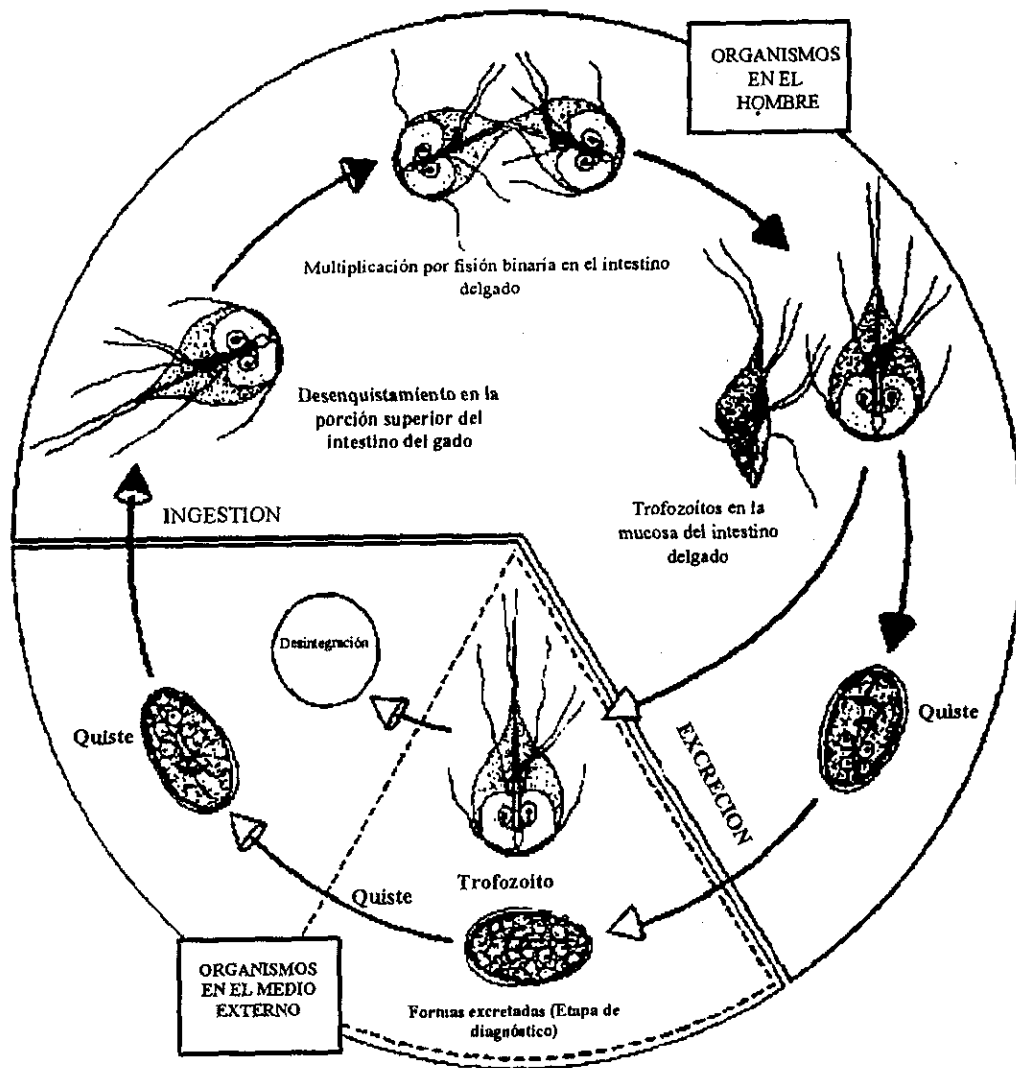


Figura 1. CICLO DE VIDA DE *Giardia lamblia* (Tomado de Meyer, 1974).

• CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la giardiosis son influenciadas por varios factores, como son: duración de la infección, estado inmunológico y nutricional del hospedero, tamaño del inóculo y factores propios del parásito. Dependiendo de estos, la infección puede cursar de manera asintomática o sintomática.

La infección asintomática probablemente representa la forma más común de esta parasitosis y se sabe que ocurre tanto en adultos como en niños. Los factores en la relación hospedero-parásito que permiten la persistencia de la infección, pero al mismo tiempo previenen la expresión de la diarrea, no han sido definidos (Farthing, 1989). Por otro lado, se ha visto que aislados de *Giardia* varían en su capacidad para colonizar el intestino delgado del hospedero así como en su capacidad de provocar diarrea (Aggarwal y Nash, 1987; Nash y cols., 1987; Udezulu y cols., 1992). Asimismo, factores del hospedero como mecanismos de defensa de tipo inmune y no inmune pueden jugar también un papel en la prevención de la infección (Farthing, 1989).

La giardiosis sintomática aguda ha sido bien caracterizada en viajeros que se trasladan de lugares de baja a alta endemicidad (Moore y cols., 1969; Brodsky y cols., 1974). Los síntomas aparecen generalmente entre el día 3 y el 20 de la llegada y en la gran mayoría de los casos la enfermedad se auto-limita en un período de entre 2 a 4 semanas. Sin embargo, en más del 25% de los viajeros infectados los síntomas persisten durante 7 semanas o más. El síntoma predominante de este tipo de infección es diarrea, la cual al inicio es de tipo acuosa, pero puede progresar y tener las siguientes características: esteatorrea, náuseas, dolor abdominal, anorexia y con frecuencia pérdida de peso.

Aunque la infección es auto-limitante en la mayoría de los individuos sanos, una proporción (30-50%) de los casos de giardiosis aguda evoluciona a

crónica, con la presencia de diarrea crónica, frecuentemente con las características de esteatorrea. La presencia del parásito en el intestino, produce el síndrome de absorción intestinal deficiente como posible consecuencia del daño directo de los trofozoítos sobre las microvellosidades de los enterocitos, lo cual provoca atrofia de las mismas y subsecuente disminución del área de absorción (Chávez y cols., 1986; Ferguson y cols., 1990). Cerca del 50% de pacientes sintomáticos presentan evidencia bioquímica de malabsorción de grasas, vitamina A y B12. Asimismo, existe evidencia de anemia macrocítica grave debida a deficiencia de folato y malabsorción de hidratos de carbono inducida por la absorción reducida de D-xilosa. También se ha reconocido que en la giardiosis hay deficiencia secundaria de lactasa con malabsorción de lactosa como consecuencia, y la que lleva varias semanas para recuperarse después de la expulsión del parásito, además también se ha descrito un aumento en la pérdida de proteína proveniente del intestino con hipoalbuminemia asociada (Mantovani y cols., 1989; Korman y cols., 1990).

• EPIDEMIOLOGIA

La vía de transmisión de la giardiosis es fecal-oral y el mecanismo de transmisión puede ser directa persona-persona o indirecta. De manera indirecta, la giardiosis es diseminada a través de agua y los alimentos contaminados (Craun, 1986; Petersen y cols., 1988). La sobrevivencia de quistes en alimentos y la contribución de ésta como una fuente de infección no ha sido bien estudiada. Sin embargo, se han reportado un gran número de casos en donde se han identificado a los alimentos como la fuente de brotes graves de giardiosis (Adam, 1991). Se han diagnosticado casos de giardiosis desde los trópicos hasta el Artico (Meyer y Jarroll, 1980), principalmente en países subdesarrollados (Mata, 1978; Gilman y cols., 1985; Farthing y cols., 1986; Masson y Patterson, 1987) donde la exposición recurrente y la excreción asintomática de quistes son comunes (Janoff y Taylor, 1990). Por otro lado, en

países industrializados, se ha informado de epidemias importantes debidas principalmente al consumo de agua contaminada por quistes del parásito (Knight, 1980; Levine, 1990; Rose, 1991; Adiss y Davis, 1992). Se estimó que aproximadamente ocurren unas 200 000 000 infecciones por año en Africa, Asia y Latinoamérica (WHO, 1986), siendo los niños y lactantes la población más afectada (Meyer y Jarroll, 1980).

Esta parasitosis se presenta en lugares tropicales con una prevalencia que varía entre 2-5% en los países industrializados y más del 20-30% en los países en desarrollo. En México, las tasas de prevalencia varían del 3 al 23.2% de acuerdo a la localización de las comunidades estudiadas (Biagi, 1985). En algunos estudios realizados, este parásito se ha encontrado con una frecuencia del 38% en niños con diarrea crónica (Ramírez y cols, 1986) y lactantes (Telch y cols., 1974). El reporte más reciente que se tiene es de aproximadamente 50 000 casos en todo el país en el año de 1996, siendo el D.F el de mayor incidencia. (Sistema Unico de Información para la Vigilancia Epidemiológica, 1996).

• MECANISMOS DE PATOGENIA DE LA GIARDIOSIS

La patogénesis de la giardiosis aún no está bien definida, sin embargo, se han postulado varios mecanismos de daño al epitelio intestinal del hospedero los cuales intentan explicar la producción de las manifestaciones de la enfermedad, entre los que destacan: acción directa de los trofozoítos sobre las microvellosidades de los enterocitos (Gillon y cols., 1984; Chávez y cols., 1986); interferencia en el metabolismo de sales y ácidos biliares (Halliday y cols., 1988) y producción de sustancias con acción tóxica sobre las células epiteliales (Radulescu y cols., 1980). A este respecto, en un estudio realizado por Chávez y cols. (1995) en el que trofozoítos de 10 cepas de *G. lamblia* aisladas de niños

con infección se cultivaron con células epiteliales MDCK durante 12-24 h, se encontró que hubo aumento en la resistencia transepitelial de las monocapas de las células MDCK con los aislados empleados. Asimismo, el medio en el que crecieron los trofozoítos, ocasionó un aumento en la resistencia transepitelial de aproximadamente 2 veces. Conjuntamente con estos resultados, se observó por medio de microscopía electrónica de barrido y de transmisión que todos los aislados de *G. lamblia* independientemente de su origen disminuían las regiones de microvellosidades, disminuyendo posiblemente la absorción normal de alimentos. Sin embargo, se considera que la producción de enfermedad no depende de un sólo factor, y debido a esto, se continúa investigando la participación de otros factores que estén contribuyendo activamente en la patogenia de la giardiosis.

Para estudiar lo anterior, es necesario considerar la existencia de cepas y aislados del parásito que presentan diferentes grados de virulencia (Nash y cols., 1987), heterogeneidad en patrones de isoenzimas (Meloni y cols., 1988; Bertram y cols., 1983; Cedillo-Rivera y cols., 1989), así como también diferentes patrones de restricción de ADN (Nash y cols., 1985). Existen asimismo, diferencias en la infección empleando modelos animales (Aggarwal y cols., 1987; Udezulu y cols., 1992), así como en infecciones experimentales en humanos (Nash y cols., 1987).

Un aspecto de gran importancia en la patogénesis de la giardiosis se relaciona con la existencia de heterogeneidad en los antígenos de superficie presentes en diferentes aislados de *G. lamblia* (Nash y cols., 1988; Aggarwal y cols., 1988), los cuales han sido denominados proteínas variantes de superficie (VSP's). A la fecha se ha determinado la secuencia nucleotídica de cinco genes que codifican para cinco VSP's diferentes (Adam y cols., 1988; Gillin y cols., 1990; Mowatt y cols., 1991; Adam, R. D 1991; Nash y Mowatt, 1992). Las VSP's tienen como característica principal su alto contenido de cisteína, usualmente

usualmente como secuencias C-X-X-C, las que constituyen entre 11 y 125 de los aminoácidos totales de las VSP's. Además, poseen un dominio de unión a metales principalmente a Zn^{2+} , su extremo amino terminal no es conservado, pero es hidrofóbico y sirve como péptido señal. Recientemente, se demostró que las VSP's se liberan al medio permitiendo así que la superficie del trofozoíto presente una nueva VSP. A este respecto, es posible que las VSP's compitan con enzimas intestinales como las carboxipeptidasas por el Zn^{2+} , ocasionando una disminución en la actividad de las enzimas y como consecuencia malabsorción intestinal (Nash y cols., 1991).

La capacidad del parásito para presentar las VSP's al hospedero tiene importantes implicaciones, ya que si la expresión de algunos epítomos de estas es retrasada o no inducen una respuesta inmune adecuada, pudiera una infección crónica (Lewis y cols., 1987). Debido a que la variación antigénica se estudió inicialmente *in vitro*, fue importante determinar si ocurre *in vivo* y cual es la relevancia biológica. La variación antigénica ha sido bien estudiada en infecciones experimentales en jerbos (Aggarwal y Nash, 1988), humanos (Nash y cols, 1990) y ratones (Gottstein y cols., 1990) y se ha visto en estos estudios *in vitro* que la variación antigénica ocurre bajo condiciones no inmunes. En un estudio realizado en humanos, los cuales fueron inoculados con la clona GS-H7 se observó que la mayoría de los trofozoítos expresan el epítomo inicial hasta el día 14, después del cual se observa una disminución gradual en el número de trofozoítos, en el día 22 ninguno de los parásitos expresan este epítomo. Cuando se analizaron trofozoítos en el día 18 se encontró que expresan múltiples VSP's y que se da una respuesta humoral marcada. El desarrollo de una respuesta humoral al mismo tiempo que la VSP inicial fue reemplazada, sugiere que algún anticuerpo elimina a los trofozoítos que expresan la VSP inicial. Además, se detectó posteriormente una respuesta de tipo celular debida a la presencia de células cooperadoras $CD4^+$ en pacientes infectados con las clonas GS y GS-H7. Por lo que se sugiere que la respuesta humoral es

importante en la variación antigénica *in vivo*, aunque el mecanismo efector actual involucrado no se conoce, y no hay evidencias directas que relacionen la producción de IgA con la variación antigénica en *Giardia*. Las VSP's son distintas antigénicamente y difieren en sus características biológicas. Así, las clonas que expresan VSP's específicas difieren en la susceptibilidad a α -quimotripsina o tripsina (Nash y cols., 1991), ya que se ha visto que después de la adición de alguna de estas proteasas, la mayoría de los trofozoitos mueren pero algunos sobreviven y estos son resistentes a las proteasas. Las VSP's expresadas por las clonas susceptibles sufren la digestión de la proteasa, pero las VSP's de las clonas resistentes no son afectadas. La no susceptibilidad a las proteasas intestinales es una ventaja selectiva *in vivo* para que los trofozoitos expresen las VSP's y el parásito permanezca en el intestino. Estas proteínas difieren en el tipo y naturaleza del metal que unen, lo cual pudiera darles ventajas biológicas aún no determinadas.

Otro aspecto de gran relevancia en el estudio de la patogénesis de la giardiosis se relaciona con la capacidad de adhesión de *Giardia* a las células epiteliales del intestino, la cual representa durante el proceso infeccioso una parte esencial para la colonización y persistencia del parásito.

Hasta la fecha, se han propuesto tres posibles mecanismos de adhesión de *Giardia* a las células epiteliales:

- Mediante una fuerza de succión generada por debajo del disco ventral por movimientos propulsivos del flagelo ventral (Crossley y cols., 1983; Knaippe, 1990; Magne y cols., 1991).
- Por procesos mecánicos relacionados con proteínas contráctiles del disco adhesivo y del borde ventrolateral (Crossley y cols., 1983; Peattie, 1990; Chávez y cols., 1995).

- Por medio de moléculas de superficie que permiten la unión del trofozoíto a receptores en las células epiteliales del hospedero (Lev y cols., 1986; Ortega-Pierres y cols., 1991; Pegado y cols., 1994).

Así, Knaippe (1990) analizó el fenómeno de unión de la cepa Portland 1 de *G. lamblia* a monocapas celulares confluentes de MDCK, empleando técnicas de microscopía de luz y electrónica. En este estudio se sugirió que el disco adhesivo, así como el borde ventrolateral son las estructuras involucradas en la adhesión al sustrato. Asimismo, se observó que este proceso depende de un metabolismo activo y es inhibido por oxígeno, temperatura baja, concentraciones bajas de cisteína y que los elementos del citoesqueleto del disco, son los principales mediadores de este proceso. Además, existen evidencias de que los inhibidores de microtúbulos, incluyendo antagonistas de la β -tubulina inhiben la adhesión *in vitro* (Meloni y cols., 1990; Edlind y cols., 1990; Magne y cols., 1991).

En cuanto al segundo mecanismo de adhesión, que involucra la participación de proteínas contráctiles del disco ventral se sabe que éste es relativamente rígido, sin embargo, el borde que se proyecta alrededor del disco es flexible, y se han identificado varias proteínas contráctiles en este borde, que permiten el contacto con el borde de las microvellosidades del intestino delgado (Feely y cols., 1982; Adam, 1991). Asimismo, se ha demostrado que el disco ventral contiene proteínas de citoesqueleto únicas llamadas giardinas, las cuales pueden ser de dos tipos: β -giardinas y α -giardinas. Estas proteínas fueron identificadas primero como un par de proteínas de aproximadamente 30 kDa, que pueden ser extraídas a partir del citoesqueleto de *Giardia*, pero más recientemente se han definido como un grupo de proteínas del citoesqueleto de entre 29-38 kDa. Se cree que tanto las α -giardinas como las β -giardinas juegan un papel importante en el funcionamiento del disco ventral y son buenos

candidatos para la acción de agentes químicos (Crossley y Holberton, 1983; Peattie, y cols., 1989; Peattie, 1990; Chávez y cols., 1995)

Además de la tubulina y las giardinas se ha estudiado el papel de la vinculina. Esta molécula une al citoesqueleto con la membrana plasmática y está localizada en el sitio de adhesión en muchos puntos de contacto célula-célula y célula-sustrato. Narcisi y cols. (1994) mediante análisis de inmunoelectrotransferencia (IET) identificaron en *Giardia* actina, α -actinina y vinculina. Además, estos autores examinaron mediante microscopía de interferencia (IRM) e inmunofluorescencia (IF) la unión de los trofozoítos de *Giardia* al vidrio. La técnica de IRM define la cresta lateral, el flanco lateral y los lados como áreas de contacto estrecho entre el parásito y el sustrato. Estas regiones se correlacionaron con la localización por IF de actina como α -actinina y vinculina. Se demostró que la actina se encuentra en la cresta lateral, mientras que la α -actinina se observó en la periferia del disco ventral y en algunos sitios de la cresta lateral. La vinculina se localizó en el área desnuda, en las áreas de sobreposición del disco ventral y algunas porciones de la cresta lateral, así como en el borde ventrolateral. Esta relación que se encontró entre la localización de la vinculina y los sitios de contacto sugiere que la vinculina juega un papel importante en el proceso de adhesión de *Giardia*.

Por otro lado, en el proceso de adhesión del parásito a células epiteliales, mediante la participación de moléculas presentes en la superficie del mismo, se ha caracterizado en los trofozoítos de *Giardia* una lectina, denominada taglina, que se une a manosa 6-fosfato; la existencia de ésta se ha propuesto como otro mecanismo de adhesión del parásito a las células del intestino. Esta lectina es específicamente activada por exposición a tripsina, una proteasa que está presente en abundancia en el sitio de la infección. La actividad de taglina se demostró por unión directa de los eritrocitos de conejo a proteínas de *Giardia* en el mismo intervalo de peso molecular que las que fueron

reconocidas por un anticuerpo monoclonal específico para la lectina identificándose por IET un doblete de proteínas de 28 y 30 kDa. Por otro lado, los trofozoítos vivos reaccionaron con el anticuerpo monoclonal y mediante IF, se confirmó la localización de la taglina en la membrana plasmática. Además de la especificidad de la lectina por residuos de fosfato determinada por ensayos de inhibición de la hemaglutinación, se vió que el fosfato de la superficie celular es determinante para la unión de la taglina a los eritrocitos. La remoción de este fosfato por tratamiento con fosfatasa alcalina da como resultado la pérdida de la hemaglutinación inducida por la taglina. Estos resultados sugieren que la taglina es importante para la unión de los trofozoítos a las células del hospedero (Hill y cols., 1981; Lev y cols., 1986; Farthing y cols., 1986; Ward y cols., 1987; Ward y cols., 1990).

Aunado a lo anterior, se han obtenido anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos de proteínas de superficie y se ha demostrado que estos inhiben la adhesión del trofozoíto de *G. lamblia* a células MDCK (Ortega-Pierres y cols., 1991). Además, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) se observó que uno de estos anticuerpos monoclonales (IG3) reaccionaba con más del 99% de trofozoítos de la cepa WB y menos del 1% con la clona C7, obtenida de esta cepa, la cual es deficiente en su capacidad de adhesión (Hernández, 1992). Por otro lado, en ensayos de IET al emplear extractos totales de la cepa WB, el anticuerpo IG3 reconoció predominantemente una proteína de 200 kDa, la cual no fue reconocida en la clona C7. El hecho de que la clona C7 sea deficiente en adhesión y no tenga la molécula de 200 kDa, sugiere la participación de ésta en el proceso de adhesión de los trofozoítos de *G. lamblia* a las células epiteliales. Además al emplear un modelo animal se observó que la clona C7, deficiente en adhesión tuvo una menor capacidad de colonización del epitelio intestinal (Hernández, 1992).

En los ensayos de adhesión *in vitro* arriba descritos, se empleó la línea celular epitelial MDCK, que proviene de riñón de perro. La utilización de esta línea celular se ha cuestionado por no ser el tipo celular adecuado de la giardiosis, por lo que actualmente existe la tendencia a emplear líneas celulares que se acerquen más al modelo natural. A este respecto, McCabe y cols. (1991) desarrollaron un modelo *in vitro* para estudiar la unión de los trofozoítos de *G. lamblia* a una línea celular epitelial intestinal de rata (IEC-6). La línea celular IEC-6 deriva de intestino delgado de rata; retiene características inmunológicas, enzimáticas y morfológicas de las criptas celulares de intestino de rata, además de ser similar a las criptas celulares en la presencia de factores que regulan la proliferación celular. El proceso de adhesión de *Giardia* a la línea IEC-6 se confirmó por microscopía electrónica de transmisión y de barrido, observándose que los trofozoítos permanecen unidos a las células epiteliales por 24 h con poca evidencia de daño a estas células. Además, la preincubación de los trofozoítos con las citocalasinas A, B y D redujo la adhesión aproximadamente 20%, mientras que la colchicina no tuvo efecto alguno. El efecto de quelación de cationes divalentes con EDTA y EGTA disminuyeron la adhesión del parásito a la línea celular IEC-6 en un 24% y 26% y la incubación a 4°C, también redujo la adhesión 7%. Cuando los trofozoítos o las células IEC-6 se fijaron con glutaraldehído, se observó una marcada disminución en la adhesión al sustrato (17 y 40%).

Asimismo, Pegado y Souza (1994), estudiaron el proceso de adhesión de los trofozoítos de *G. lamblia*, a la línea epitelial IEC-6 utilizando monosacáridos, lectinas, periodato, tripsina y neuraminidasa. En este estudio se demostró que la adición de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa y fucosa al medio de interacción inhiben la unión de los parásitos a las células epiteliales. Experimentos en los cuales los parásitos o las células epiteliales fueron tratadas con diferentes azúcares antes de la interacción, mostraron que estos monosacáridos interfieren con ambas superficies celulares. Además, se

demostró que los grupos sensibles a tripsina pero no a neuraminidasa expuestos en la superficie celular, son importantes para la asociación parásito-célula epitelial.

Los estudios realizados con la línea celular IEC-6, demuestran que este modelo *in vitro* puede ser de utilidad para investigar los mecanismos por los cuales los trofozoitos de *Giardia* se unen a las células intestinales (inicio de la infección) e inducen la enfermedad.

• PROTEASAS

- GENERALIDADES

El rompimiento proteolítico de enlaces peptídicos es una de las más frecuentes e importantes modificaciones de proteínas. Históricamente, la proteólisis enzimática ha sido generalmente asociada con la digestión de proteínas en animales y humanos. De esta manera, las proteasas digestivas de las secreciones pancreáticas y gástricas están entre las enzimas mejor caracterizadas y mucho del conocimiento general de la estructura de las proteínas y de la función enzimática se ha derivado del estudio de estas proteasas. Investigaciones sobre la cinética, especificidad e inhibición, junto con análisis detallados de la secuencia de aminoácidos y estructura de rayos-X, han permitido la identificación de los componentes y la geometría de sus sitios activos, y a partir de estos, los mecanismos de acción de estas proteasas digestivas fueron deducidos. Las proteasas pueden ser clasificadas en familias, los miembros de cada familia tienen estructuras y mecanismos de acción similares.

Existe una gran variedad de procesos en los que intervienen las proteasas celulares, sin embargo, sus funciones generales son principalmente dos:

- a) Crear moléculas biológicamente activas,
- b) Catabolizar proteínas y péptidos con actividad biológica.

El primer grupo incluye a las proteasas involucradas en la transmisión de señales hormonales y la formación de enzimas activas a partir de zimógenos correspondientes. El segundo grupo incluye proteasas de lisosomas cuya actividad en la célula permite destruir proteínas normales o anormales. Así,

estas proteasas controlan la concentración de polipéptidos y enzimas en las células y permite la renovación constante del contenido celular.

Además de estas dos funciones generales, las proteasas participan en otros procesos como son: la reorganización del citoesqueleto, síntesis proteica, fusión de mioblastos y diferenciación, memoria, activación e inactivación de hormonas, fertilización, crecimiento y envejecimiento celular, creación de moléculas que puedan ser reconocidas inmunológicamente, degradación de material endocitado y necrosis (Bond y Butler., 1987).

Por otro lado, las enzimas proteolíticas son herramientas importantes para análisis de secuenciación de proteínas y en la identificación y aislamiento de dominios de las proteínas multifuncionales más complejas (DeMartino y cols., 1987). De forma inversa, el aislamiento de proteínas intactas nativas a partir de tejidos biológicos requiere la inactivación selectiva de proteasas mediante inhibidores específicos.

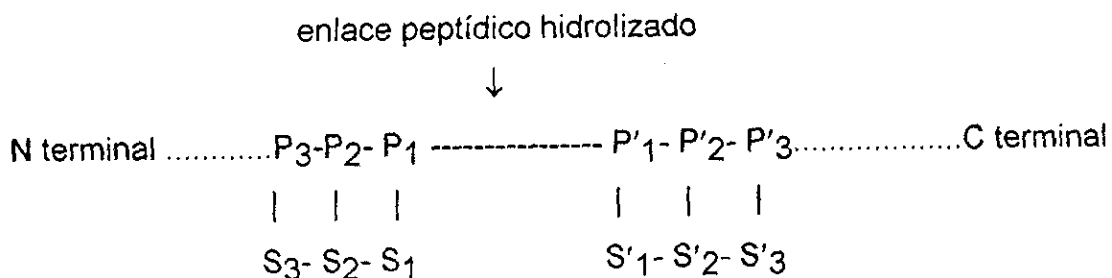
• NOMENCLATURA

Las proteasas como ya se mencionó anteriormente, son enzimas que degradan proteínas mediante la hidrólisis de enlaces peptídicos. A este respecto, se han descrito dos tipos principales de enzimas proteolíticas: las proteinasas o endopeptidasas, que comparten la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos internos y las exopeptidasas, las cuales degradan a partir de un extremo de la cadena polipeptídica, ya sea el extremo carboxilo o el amino terminal, o también llamadas más específicamente, carboxipeptidasas a las primeras y aminopeptidasas a las segundas (Barrett, 1986).

• **CLASIFICACION Y MECANISMO**

Inicialmente, las proteasas fueron clasificadas de acuerdo a su peso molecular, carga o especificidad de sustrato. Actualmente, el sistema de clasificación está basado en la comparación de los sitios activos, mecanismos de acción y estructura tridimensional. Cuatro clases son reconocidas por la Unión Internacional de Bioquímica y dentro de estas clases son reconocidas seis familias. Cada familia tiene un grupo característico de residuos de aminoácidos funcionales arreglados en una configuración particular para formar el sitio activo. Los miembros de cada familia se cree que han descendido de un ancestro común por evolución divergente (Ward y cols., 1997).

La especificidad de las proteasas está determinada en parte por la secuencia de aminoácidos de la proteína blanco. Así, la nomenclatura aceptada para los diferentes sitios de aminoácidos del sustrato, es el siguiente:



El sitio de unión para cada uno de estos aminoácidos en la proteinasa es denominado como S (North y cols., 1990b).

Los cuatro grupos de proteasas son: **cisteína-proteasas, serina-proteasas, aspártico-proteasas y metalo-proteasas** (McKerrow y Doenhoff, 1988).

• CISTEINA-PROTEASAS

Las proteasas de tipo cisteína contienen un residuo de cisteína esencial el cual está involucrado en la formación de un complejo covalente intermediario con el sustrato. La catálisis procede vía intermediario tiol-éster y es facilitado por los lados de la cadena adyacentes a la histidina 159 adyacente y ácido aspártico 158.

Las proteasas de este tipo incluyen varias catepsinas lisosomales de mamífero, las proteasas activadas por calcio (calpainas) y las proteasas de plantas papaína y actinidina. La papaína (EC 3.4.22.2) es el miembro mejor estudiado de la familia de las cisteína-proteasas. Las proteasas de este tipo se encuentran en varias superfamilias relacionadas evolutivamente, tres de las cuales están representadas por la proteasas de *Streptococcus*, la clostripaína de *Clostridium histolyticum* y por la papaína de *Carica papaya*.

La mayoría de las proteasas de este tipo descritas en células de mamífero, se encuentran principalmente en el citosol o en lisosomas y ejercen su acción en estos compartimentos. Estas proteasas tienen actividad proteolítica poco específica y pueden estar involucradas en las etapas inicial o final de degradación extensiva de proteínas (Bond y Butler, 1987).

Las cisteína-proteasas son inhibidas por agentes bloqueadores del grupo tiol como el p-Hidroximercuribenzoato (pHMB) y por agentes alquilantes como el iodoacetato, iodoacetamida, N-etilmaleimida (NEM), peptidil-clorometil-cetonas y peptidil-diazometanos. Asimismo, algunos reactivos como aldehídos y nitrilos

también pueden inhibirlas (North, 1982). Estas enzimas son activadas por agentes reductores que regeneran grupos tiol a partir de puentes disulfuro, tales como el ditioneitol y β -mercaptoetanol (Bond y Butler, 1987)

Las cisteína-proteasas se han encontrado en la mayoría de los protozoarios parásitos y típicamente presentan gran actividad por lo menos en un estadio del ciclo de vida. Además se ha reportado que muchos protozoarios presentan cisteína-proteasas las que comparten propiedades con la papaína y tienen un peso molecular aproximado de 25 kDa. En general, muchas de ellas son comparables en tamaño a las enzimas de las plantas y animales, pero algunas especies contienen cisteína-proteinasas que pueden tener un peso molecular considerablemente mayor. En la mayoría de los casos estas enzimas son de tipo lisosomal. El análisis de secuenciación de fragmentos de ADN de las cisteína-proteinasas de algunos protozoarios, han mostrado gran similitud tanto con la secuencia de ADN de otros miembros de la familia cisteína-proteinasas de eucariontes, como en la conservación de la tríada catalítica formada por los residuos de cisteína, histidina y asparagina del centro activo (Eakin y cols., 1990)

• SERINA- PROTEASAS

Las proteinasas del tipo serina, incluyen dos distintas familias: las serina-proteasas de mamíferos (tripsina, quimotripsina y elastasa) y las serina-proteasas bacterianas (subtilisina). La familia de serina-proteasas mejor caracterizada y fisiológicamente más versátil es la de mamíferos. Este tipo de proteasas se han encontrado en eucariontes e incluye proteasas extracelulares como la tripsina, elastasa, trombina, proteasas involucradas en la cascada de coagulación sanguínea y proteasas celulares. La mayoría de estas proteinasas en las células de mamíferos se encuentran en gránulos secretorios como los

gránulos azurófilos, o en gránulos especializados. Algunas están involucradas en reacciones de procesamiento específico de proteínas y otras son proteasas generales que ejercen su acción cuando se secretan.

La principal característica de los sitios activos de este tipo de proteinasas es la tríada catalítica de Asp 102-His 57-Ser 195; la reacción de catálisis procede vía un intermediario tetrahédrico de transición durante los pasos de deacilación y acilación, involucrando la unión covalente de los sustratos al residuo de serina (Beynon y Bond, 1994).

Las diferencias en la especificidad de sustratos pueden estar relacionadas con las sustituciones del sitio primario de unión del sustrato, comúnmente denominado como P₁ y las diferencias menores, en los sitios de unión secundarios (P₂). La orientación y accesibilidad del sitio de rompimiento en la cadena polipeptídica son también importantes para determinar la especificidad de estas proteinasas (Mason, 1991).

En general, todas las serina-proteasas son inhibidas por Diisopropilfluorofosfato (DipF), la mayoría por Fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) y algunas por clorometilcetonas como TLCK (N-p-tosil-L-lisil clorometilcetona) y TPCK (L-1-cloro-3-[4-tosilamido]4-fenil-2-butanona, tosil fenilalanil clorometilcetona)(Beynon y Bond, 1994).

• ASPARTICO- PROTEASAS

Las aspártico-proteasas incluyen a la penicilopepsina bacteriana, la pepsina de mamíferos, la renina y la quimosina y ciertas proteasas de hongos. Estas proteasas contienen en su sitio activo dos residuos de ácido aspártico involucrados en la catálisis proteica. En general, se considera que en el mecanismo de este tipo de enzimas está involucrada una catálisis tipo ácido-

base, ya que en el intervalo de pH activo (2-4) una molécula de ácido aspártico es ionizada y la otra molécula es desionizada y no se da la formación de un intermediario covalente enzima-sustrato. En el mamífero, las pocas aspártico-proteinasas que se han identificado en las células se encuentran asociadas a gránulos secretorios, membranas, endosomas o lisosomas. La principal enzima intracelular de este tipo es la catepsina D, que es una enzima lisosomal y la renina, que se encuentra en gránulos secretorios en el riñón. Las proteasas de algunos virus incluyendo el VIH, también se encuentran dentro de este tipo de enzimas (McKerrow y Doenhoff, 1988; Mason, 1991).

Algunas aspártico-proteasas extracelulares bien estudiadas se encuentran en el tracto intestinal como la pepsina y la quimosina que se localiza en el estómago de la ternera.

Este tipo de enzimas, de manera general son inhibidas específicamente por Pepstatina, un hexapéptido, el cual en el estado de transición regenera sustratos normales; además por Epoxi-(p-nitrofenoxi)-propano y por compuestos diazoacetilo como el Diazoacetil-norleucina-metil-éster (North, 1982).

• METALO-PROTEASAS

Las enzimas de este tipo contienen en su sitio activo un ión metálico, el cual desempeña un papel clave en la unión al sustrato, ya que éste está unido a dos cadenas laterales de histidina y a una de ácido glutámico. La molécula también tienen sitios de unión para Ca^{2+} , y este ión es importante para estabilizar la unión más que para la actividad catalítica (Kester y Matthews, 1977).

Las metalo-proteasas se encuentran ampliamente distribuidas en organismos procariontes y eucariontes, incluyen algunas enzimas de vertebrados como las colagenasas, carboxipeptidasas, aminopeptidasas y las elastasas de los macrófagos y *Pseudomonas*.

Las metalo-proteasas que se encuentran en células de mamíferos están asociadas con el retículo endoplásmico, membrana plasmática, mitocondrias y citosol; son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA (Acido etilendiamino tetraacético) y 1,10-fenantrolina; algunas son inhibidas por Fosforamidón.

Las cuatro clases de proteasas descritas actúan de manera óptima a determinados intervalos de pH: las aspártico-proteasas a 2.5-4.5, las proteasas de cisteína: 5.5-7.5, las metalo-proteasas y de tipo serina en un valor neutro y ligeramente alcalino (McKerrow y cols., 1993)

- **ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN PARASITOS Y SU RELACION CON LA PATOGENICIDAD.**

En los últimos años, se ha observado un creciente interés por dilucidar las funciones que las proteasas realizan en los parásitos y su participación en la relación hospedero-parásito. Algunas de ellas son sintetizadas en diferentes estadios del ciclo de vida del parásito y presentan actividad elevada de algún tipo de proteasa por lo menos en un estadio del ciclo de vida. Las proteasas de parásitos facilitan la invasión de los tejidos del hospedero así como la evasión de la respuesta inmunológica del mismo. Además, contribuyen a que se lleven a cabo los cambios morfológicos del parásito y que éste efectúe el metabolismo dentro del hospedero (McKerrow y Doenhoff, 1988).

En el caso de extractos totales los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1- IMSS se ha detectado actividad colagenolítica. Esta actividad proteolítica actúa preferencialmente sobre la colágena tipo I y se encuentra asociada a la membrana del parásito, además depende del contacto con la célula blanco (Muñoz y cols., 1982). Algunas otras proteasas de este parásito se han identificado, en especial, se ha caracterizado una enzima con un peso molecular de 41 kDa que hidroliza hemoglobina a pH ácido y su actividad es semejante a la de la catepsina D, además de una cisteína-proteasa que tiene un peso molecular de 27 kDa (McLaughlin, 1977).

Lushbaugh y cols. (1985), reportaron la purificación de una proteasa de tipo cisteína con peso molecular de 16 kDa de las cepas HM1-IMSS (alta virulencia) y HK-9 (menor virulencia). La enzima hidroliza azocaseína, hemoglobina y carboxi-L-arginil-L-arginil-7-amino-4-trifluorometilcumarina (Z-arg-arg-AFC), un sustrato preferencial de la catepsina B de mamífero, razón por la que denominaron esta actividad proteolítica como catepsina B de *E. histolytica*. La enzima causó un redondeamiento y desprendimiento de las

células HeLa en cultivo. Este efecto fue inhibido con antipaina, un inhibidor de cisteína-proteasas y reforzado por cisteína. En estos estudios, se observó que la cepa HM1-IMSS presentó mayor actividad proteolítica en comparación con la cepa HK-9, lo que sugiere una correlación de la actividad invasora con la cantidad de proteasa presente en cepas de este parásito con diferentes grados de virulencia.

En otro estudio, Luaces y Barret (1988), purificaron una proteasa de tipo cisteína llamada histolisina a partir de extractos solubles de la cepa HM1-IMSS. Esta enzima tiene un peso molecular de entre 26 a 29 kDa y tienen actividad sobre diferentes sustratos como azocaseína y Z-arg-arg-NHMec, no degrada colágena tipo I o elastina, pero es activa contra proteoglicanos de cartilago y colágena de membrana basal del glomérulo renal. Asimismo, se observó que esta enzima ocasiona redondeamiento y desprendimiento de fibroblastos humanos en cultivo y presenta características diferentes a las de la catepsina B.

Por otro lado, los papeles potenciales múltiples de las proteasas de tipo cisteína extracelulares principales, en la infección e invasión mediante *E. histolytica* están bien estudiados. Antes de la invasión del intestino, estas enzimas degradan la matriz extracelular y las mucoproteínas del hospedero, disgregan las células epiteliales y degradan la membrana basal epitelial. Las enzimas liberadas en el torrente sanguíneo del hospedero puede contribuir directamente con la patogénesis. Estas cisteína-proteasas extracelulares pueden interferir con la respuesta inmune degradando IgA e IgG, y también activan la vía alterna de complemento, mientras evita la reacción inflamatoria por inactivación de las anafilatoxinas C3a y C5a. Estudios recientes en un modelo murino con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) han establecido firmemente el papel de las proteasas de tipo cisteína en la formación de los abscesos amibianos de hígado. Además como mínimo, 6 genes que codifican

para proteínas de la familia de la papaína han sido clonados, además de que tienen cierta homología con la subfamilia de la catepsina L. La proteasa de tipo cisteína mayoritaria, muestra preferencia por sustratos de la catepsina B, su valor óptimo de pH es neutro y es inhibida por inhibidores específicos para proteasas de tipo cisteína. Las cepas invasivas de *E. histolytica* expresan altos niveles de ARNm específico para cisteína-proteasas y liberan una gran cantidad de enzima activa. Mediante el análisis estructural y cinético de las proteasas de *E. histolytica* que provee características acerca de su función bioquímica se facilita el diseño de inhibidores específicos que puedan usarse como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la amibiasis (Que y Reed, 1997).

Otro parásito protozoario en el que se ha detectado actividad de proteasas específicas de estadio, la cual es requerida para llevar a cabo un gran número de funciones, es *Plasmodium falciparum*. La actividad proteolítica se ha determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS con sustrato de gelatina, en trofozoítos y esquizontes, presentando actividad de cisteína-proteasas con peso molecular de 28 (trofozoíto) y 35-40 kDa (esquizonte-merozoíto), respectivamente. Además, en los merozoítos se detectó actividad de proteasas de serina con un peso molecular de 75 kDa. Estudios de inhibición de proteinasas realizados en eritrocitos infectados con trofozoítos, sugieren que éstas participan de manera importante en la degradación de la hemoglobina de los eritrocitos del hospedero, y para que esto se lleve a cabo, es necesaria la actividad de una proteasa de cisteína (hemoglobinasas) localizada en la vacuola alimenticia del trofozoíto. Asimismo, se observó que el empleo de inhibidores de cisteína-proteinasas impidió la multiplicación del parásito (Rosenthal y cols., 1987, 1988, y 1989). La actividad estadio específica de la proteasa de 35-40 kDa en los esquizontes así como la de 75 kDa en los merozoítos, sugiere que estas proteasas se encuentran involucradas en la etapa final de la diferenciación intracelular del parásito o en los eventos que llevan a la ruptura e invasión de los eritrocitos (Rosenthal y cols., 1987).

En relación a *Trypanosoma cruzi* se han reportado varios trabajos donde las proteasas de *T. cruzi* juegan un papel importante en la biología del parásito: algunas intervienen en la replicación de los amastigotes (Harth y cols., 1992); también se ha observado que durante la metacicloogénesis varía la expresión de proteasas del parásito (Bonaldo y cols., 1991); y se ha sugerido la participación de proteasas en la adhesión e infección a fibroblastos (Piras y cols., 1985). De la misma manera, al inhibir tales proteasas con inhibidores químicos o tratarlas con anticuerpos monoclonales monoespecíficos se encontró que disminuía significativamente la ingestión de parásitos por macrófagos y células musculares de corazón (Meirelles y cols., 1992; Souto-Padrón y cols., 1990). Por otro lado, los tripomastigotes pueden romper las moléculas de IgG unidas a la membrana desprendiendo la parte Fc y quedándose sólo con la fracción Fab, este proceso podría ayudarles a pasar inadvertidos al circular por el organismo del hospedero (Pereira, 1990).

En los lisosomas de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes se ha demostrado la presencia de una glucoproteína de 60 kDa, con alto contenido de manosa. La secuencia parcial de ésta presenta alta homología con la papaína y la catepsina L. También, ha sido localizada sobre la superficie de amastigotes y epimastigotes, mientras que en los tripomastigotes se ha localizado en la bolsa flagelar del organismo. Esta enzima, como se mencionó anteriormente es la que presenta la actividad mayoritaria en epimastigotes, la cual es llamada **cruzipaina**.

Experimentos recientes han indicado que la cruzipaina, es capaz de degradarse así misma (Hellman y cols., 1991), siendo el dominio maduro completamente degradado en pequeños péptidos, mientras que una secuencia glucosilada de 25 kDa resistente a proteólisis y que corresponde al dominio carboxilo terminal permanece incambiable (Mottram y cols., 1989).

Por otro lado, Greig y Ashall (1990), empleando minigeles mostraron que aunque la proteinasa de entre 50-60 kDa es la actividad predominante, hay como mínimo tres bandas más, de alto peso molecular y en su mayoría son del tipo cisteína, lo cual fue demostrado por el empleo de inhibidores específicos, así como también probablemente una banda que corresponde a una metaloproteasa.

Además de las proteasas de tipo cisteína y metalo, hay evidencias de la presencia de una proteasa de tipo serina (Sakanari y cols., 1989; Greig y Ashall, 1990). En estos estudios se empleó PCR para amplificar el ADN genómico utilizando secuencias consenso que flanquean los residuos del sitio activo (His, Asp y Ser) como iniciadores. En el caso de *T. cruzi*, un fragmento de 438 pares de bases fue obtenido y secuenciado y se encontró que contiene regiones que codifican para las secuencias conservadas de aminoácidos del sitio activo de una serina-proteasa. De esta manera, aún cuando no se ha encontrado actividad de proteasa de tipo serina en este parásito, sí se tiene un gen que codifica para ésta.

Más recientemente, se reportó la secreción *in vitro* de proteasas por epimastigotes de *T. cruzi* de 13 cepas mexicanas provenientes de diferentes partes de la República Mexicana y de 3 cepas sudamericanas. Todas las cepas secretaron una proteasa de 40 kDa y la cepa NINOA del estado de Oaxaca secretaba además, una proteasa de 60-70 kDa. La actividad de la proteasa de 40 kDa es afectada por TLCK, E-64, leupeptina y 1,10-fenantrolina, además es activada por cisteína, por lo que se considera una proteasa de cisteína. Su actividad es más alta a pH 4 y es nula a pH 11. La actividad de la proteasa de 60-70 kDa es afectada por 1,10-fenantrolina, EDTA y TLCK; no es activada por cisteína por lo que es probable que sea una metalo proteasa. Esta enzima es activa a pH ácido o básico sin diferencias significativas en sus niveles de actividad. La proteasa de 40 kDa es reconocida por anticuerpos policlonales

dirigidos contra la cruzipaina por lo que es posible que se trate de esta enzima (Nava, 1997).

Otro parásito protozoario con gran actividad proteolítica es *Trichomonas vaginalis*. Lockwood y cols. (1987) empleando geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina mostraron que *T. vaginalis* tiene por lo menos 11 cisteína-proteasas diferentes y purificaron por filtración en gel dos proteasas intracelulares, la D y la H con pesos moleculares de 18 y 64 kDa, respectivamente. Todas estas proteasas son inhibidas por reactivos específicos para cisteína-proteasas como: E-64 y cistatina (North y cols., 1990a). Sin embargo, su gran complejidad ha sido demostrada utilizando geles de poliacrilamida-SDS copolimerizado con gelatina en doble dimensión, observándose 23 distintas proteasas, las cuales tienen puntos isoeléctricos entre 5.7 a 7.0 (Neale y Alderete, 1990). Las proteasas con puntos isoeléctricos menores han sido detectadas por geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina en una dimensión, en general, estas proteasas son más ácidas. También se han purificado dos cisteína-proteasas extracelulares, la primera de estas proteasas tiene un peso molecular de 60 kDa y es separada en subunidades de 23 y 43 kDa; mientras que la segunda enzima tiene un peso molecular de 30 kDa (Garber y Lemchuk-Favel., 1989).

Para estudiar la actividad de las proteasas D y H se han probado diferentes sustratos, resultando uno de los mejores, la nitroanilina Bz-Pro-Phe-Arg-Nan (Bz= benzoil; Nan= nitroanilida) y los sustratos preferidos fueron aquellos combinados con arginina en la posición P₁ con un residuo voluminoso en la posición P₂ (Lockwood y cols., 1984; 1986). El uso de sustratos fluorogénicos (peptidil-amino-metilcumarinas) en combinación con PAGE-SDS-gelatina (North y cols., 1990) ha permitido determinar la especificidad del sustrato de cada enzima sin necesidad de purificarlas.

Por otro lado, Bozner y Démeç (1991), reportaron dos enzimas presentes en *T. vaginalis* con peso molecular alto, las cuales son inhibidas por EDTA, por lo que se les consideró metalo-proteasas.

En cuanto a la participación de proteasas de *Trichomonas* en el proceso de adhesión a células epiteliales vaginales humanas y a células HeLa, se ha demostrado que el tratamiento del parásito con inhibidores de proteasas (TLCK) abate la adhesión del parásito a las células del hospedero. Cuando se les permite sintetizar y re-expresar las proteínas de superficie a las *Trichomonas* tratadas con tripsina, vuelven a adquirir el fenotipo de adhesión. La función exacta de las proteasas en el proceso de adhesión del parásito permanece desconocida, aunque se propone que tienen función desenmascarante de las adhesinas presentes en la superficie del parásito las cuales son protegidas por proteínas, requiriendo ser expuestas para que sean funcionales (Alderete y cols., 1995).

Con respecto a *G. lamblia*, existen pocos estudios relacionados con la caracterización de su actividad proteolítica. Así, Feely (1985) identificó por microscopía electrónica y análisis citoquímico actividad de hidrolasas dentro de vacuolas localizadas por debajo de la membrana plasmática del trofozoíto y de la pared quística, sugiriendo que las vacuolas funcionan como lisosomas, aún cuando la función de estas estructuras no es muy clara.

Posteriormente, Lindmark (1988), demostró acción de hidrolasas en un extracto del parásito y más tarde Hare y cols. (1989), demostraron la acción de proteasas tipo cisteína en extractos de la cepa Portland 1 y mediante geles de poliacrilamida-SDS con gelatina se observó la aparición constante de dos bandas de actividad proteolítica con un peso aproximado de 40 y 105 kDa y de manera inconstante apreciaron otras dos bandas de pesos de 80 y 95 kDa.

Asimismo, Parenti (1989) detectó que el 55% de la actividad proteolítica de *G. lamblia* se localizaba en la fracción soluble del homogenizado de trofozoítos, la cual aumentó con pretratamiento con detergente no iónico, sugiriéndose que la actividad enzimática estaba asociada a la membrana o a fracciones subcelulares. Además, en este estudio, con el empleo de la técnica de cromatografía de filtración, se detectaron dos actividades proteolíticas: la principal y mayor actividad enzimática mostró un peso molecular de 38 kDa; la segunda actividad enzimática tuvo un peso molecular de 66 kDa. Las enzimas hidrolizaron los siguientes sustratos: hemoglobina, IgA, IgAs, IgG y el sustrato sintético Bz-arginina- naftlamida (BANA), variando el pH óptimo de acuerdo al sustrato empleado. Estas enzimas se caracterizaron como proteasas de tipo cisteína con el empleo de agentes activadores e inhibidores del grupo tiol.

Más tarde, Werries y cols. (1991), purificaron dos cisteína-proteasas con pesos moleculares de 95 y 35 kDa, a partir de homogenizados de trofozoítos de la cepa WB. Ambas proteinasas fueron activas sobre azocaseína, cadena β de la insulina, hemoglobina desnaturalizada con urea y tetrapéptidos sintéticos que presentaban una arginina en la posición P_2 del sustrato. Sin embargo, se observaron pequeñas diferencias de especificidad cuando se emplearon algunos sustratos sintéticos.

Williams y Coombs (1995), analizaron la actividad proteolítica intracelular de la cepa P1 mediante el empleo de azocaseína y una amplia gama de sustratos peptídicos fluorogénicos y cromogénicos observándose que la actividad proteolítica total difiere considerablemente en relación con el sustrato. Estas actividades aumentaron mediante el empleo de ditioneitol (DTT) 1mM y llegaron a su máximo en el intervalo de pH de 5.5-7.0. La susceptibilidad de estas proteasas hacia varios inhibidores ha demostrado que se trata principalmente de tipo cisteína, aunque también se detectaron algunas proteasas de tipo serina, aspártico y aminopeptidasas. Así, se han detectado

dieciocho actividades proteolíticas con valores de peso molecular entre 30 y 211 kDa. Estas actividades de gelatinasas se detectaron empleando DTT y en valores de pH cercanos a 6 y fueron inhibidas por inhibidores para proteasas de tipo cisteína y serina. Cuatro de estas proteasas presentes en los geles muestran actividad hacia péptidos de amidometilcumarinas fluorogénicos, pero con diferentes preferencias de sustrato. Estos resultados muestran que *G. lamblia* contiene múltiples proteasas, muchas de las cuales son del tipo cisteína.

Por otro lado, en estudios realizados por Alvarado (1994) se analizó la actividad proteolítica en aislados de *G. lamblia* provenientes de individuos asintomáticos y sintomáticos así como de las clonas C5 (adhesión eficiente) y de C7 (deficiente en adhesión), obtenidas de la cepa WB (Hernández, 1992). En dicho estudio no se encontró relación entre la actividad proteolítica y procedencia de los trofozoítos. El análisis de los lisados obtenidos de los diferentes aislados y cepas de *Giardia*, efectuado por electroforesis en geles de poliacrilamida-gelatina al 0.2%, reveló un patrón proteolítico de entre 10 a 15 bandas, con pesos moleculares de 18 a 140 kDa. La mayor actividad proteolítica detectada se caracterizó como tipo cisteína mediante el empleo del inhibidor de proteasas TPCK y del agente reductor DTT. En este estudio se detectó actividad proteolítica en los sobrenadantes del medio donde crecieron estas clonas y el análisis electroforético reveló la presencia de cuatro bandas con actividad de proteasas con pesos moleculares de 21, 24, 26 y 85 kDa. Sin embargo, cuando los trofozoítos interaccionaban con células MDCK, la actividad proteolítica en los sobrenadantes aumentó observándose la actividad de 7 proteasas con pesos moleculares entre 25 y 93 kDa. Estos resultados muestran que los trofozoítos de *G. lamblia* secretan proteasas al medio y que la interacción de los trofozoítos con la línea MDCK estimula la secreción de un mayor número de proteasas.

Recientemente, Ward y cols. (1997), demostraron que el proceso de desenquistamiento en *Giardia muris* es bloqueado por inhibidores específicos de proteasas de tipo cisteína. De esta manera, empleando inhibidores biotinilados, se identificó y clonó la secuencia de la proteasa blanco. Esta proteasa se localizó en vesículas que liberan su contenido antes del desenquistamiento. Esta proteasa es la ramificación de aparición más temprana de la familia de la catepsina B. Esta filogenia confirma que el linaje de la catepsina B evoluciona en células eucarióticas primitivas, primero hacia la divergencia de los reinos animal y vegetal y enfatiza la diversidad de las funciones celulares que esta familia de enzimas facilita.

La elevada actividad y multiplicidad de las proteasas en el estadio de trofozoíto y probablemente de quiste de *Giardia*, indican que estas enzimas están involucradas en muchos aspectos del desarrollo y metabolismo del parásito, representando un blanco potencial para agentes quimioterapéuticos antiprotozoarios.

Sin embargo, poco se conoce acerca de la participación de las proteasas de *Giardia* en la adhesión a células epiteliales, siendo este proceso un paso esencial en la patogénesis de la giardiosis.

II.OBJETIVOS

• OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la actividad proteolítica presente en los trofozoítos de cepas y clonas de *Giardia lamblia* y determinar su participación en el proceso de adhesión a células epiteliales.

• OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar y caracterizar el tipo de proteasas presentes en lisados de trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* con diferentes capacidades de adhesión.

2.- Determinar el efecto de inhibidores de proteasas en el proceso de adhesión de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* a las líneas celulares MDCK e IEC-6.

3.- Analizar los patrones de secreción de proteasas por trofozoítos de *G. lamblia* con características de adhesión eficiente así como deficiente al interactuar con monocapas de las líneas celulares MDCK e IEC-6.

III. MATERIALES Y METODOS

1.- PARASITOS.

En este trabajo se emplearon trofozoítos de *Giardia lamblia* provenientes de la cepa WB y de 2 clonas derivadas de ésta, denominadas C5 (adhesión eficiente) y C7 (deficiente en adhesión)(Hernández, 1992).

Los trofozoítos de la cepa y de las clonas de *G. lamblia* se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1986)(Apéndice A), complementado con suero de ternera al 10% (Microlab, México) y en presencia de los antibióticos estreptomina (250 µg/mL) y penicilina (250 UI/mL), llevando a cabo subcultivos dos veces por semana (Cedillo-Rivera y cols., 1991).

2.- OBTENCION DE EXTRACTOS SOLUBLES DE TROFOZOITOS.

Los trofozoítos tanto de la cepa como de las dos clonas de *G. lamblia*, se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento mediante el enfriamiento de los tubos de cultivo a 4°C por 1 h y su posterior centrifugación a 3,500 rpm durante 10 min. El paquete celular se lavó dos veces con amortiguador salino de fosfatos (ASF) pH 7.2, y una vez resuspendido el paquete celular en una solución de sacarosa 0.25 M se tomó una alícuota para verificar la viabilidad celular con azul tripano. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en una mezcla que contenía 25 µL de sacarosa 0.25 M, 25 µL de Tritón X-100 al 0.25% (v/v) y 10 µL de amortiguador de muestra 5X en ausencia de β-mercaptoetanol. Los trofozoítos fueron lisados por agitación con pipeta de acuerdo a lo recomendado por Alvarado (1994). Los extractos solubles se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS bajo condiciones reductoras (Apéndice B). La cuantificación de

proteínas se realizó por el método de Lowry modificado por Dullery y Grieve (1975) (Apéndice D).

3.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD Y LOS TIPOS DE PROTEASAS PRESENTES EN EXTRACTOS SOLUBLES DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* EMPLEANDO UN METODO COLORIMETRICO.

Para realizar la caracterización inicial del tipo de proteasas presentes en los extractos solubles de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 se empleó un método colorimétrico utilizando azocaseína (Sigma, Chemical, C.o. St. Louis M.O, U. S. A.) como sustrato. El método se estandarizó para determinar la cantidad de proteína que permitiera trabajar en condiciones no saturadas para lo cual se emplearon diferentes cantidades de proteína (20, 40, 60, 80 y 100µg). Además, para determinar el valor de pH óptimo para las enzimas, se utilizó amortiguador tris-glicina activado (con EDTA y cisteína) en el intervalo de pH 3-8 a 37°C. Una vez determinado el valor de pH adecuado se evaluó el amortiguador sin cisteína y EDTA. Los inhibidores empleados fueron para proteasas de tipo cisteína: E-64 (trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamido-[4-guanidino]-Butano) e Iodoacetamida a concentraciones finales de 10 µM y 100 µM, respectivamente; para proteasas de tipo serina: PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) y TPCK (L-1-cloro-3-[4-tosilamido]-4-fenil-2-butanona, tosil fenilalanil clorometilcetona) a 1 mM; Pepstatina para proteasas de tipo aspártico a 1µM y para metalo proteasas: 1,10-fenantrolina y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM. Estas concentraciones son las recomendadas en la literatura (Beynon y Bond, 1994). Todos los inhibidores fueron obtenidos de Sigma, Chemical, C.O. St. Louis M. O, U.S.A.

Una vez estandarizadas las condiciones del método, se procedió a incubar 100 µg de proteína de los extractos solubles con los diferentes inhibidores por 30 min a 37°C. Posteriormente, se les adicionó amortiguador de acetatos pH 5.5 y se incubaron durante 10 min a 37° C; al finalizar este tiempo

se les adicionó azocaseína al 2% (p/v) en amortiguador de acetatos y nuevamente se incubaron a 37°C por 1 h. Posteriormente, se realizó una precipitación ácida empleando ácido tricloroacético al 3% y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min. Al finalizar, los sobrenadantes se leyeron contra su blanco de reacción a 366 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-65. En cada experimento se incluyó un control al cual no se le adicionó inhibidor. Se realizaron 6 determinaciones por triplicado cada uno, obteniéndose el porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica. Asimismo, se emplearon los inhibidores E-64, TPCK y 1,10-fenantrolina a las concentraciones de: 1mM, 0.33 mM y 1 mM, respectivamente, de acuerdo a lo descrito por Williams y Coombs (1995).

4.- CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN LOS EXTRACTOS SOLUBLES DE *G. lamblia* EMPLEANDO GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS COPOLIMERIZADOS CON GELATINA.

La actividad proteolítica de los extractos solubles de trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 se caracterizó empleando geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 0.2% (Apéndice B). Asimismo, se obtuvieron los extractos solubles de cada uno de ellos en presencia de los diferentes inhibidores de proteasas específicos para cisteína, serina y metalo proteasas, siguiendo la metodología y las concentraciones mencionadas en el inciso 3. La electroforesis se realizó en cámaras de electroforesis Mini- Protean II (Bio- Rad, U. S. A.) por 90 min a 140 volts a 4°C. En este análisis se emplearon peines de 10 pozos y 0.75 mm de grosor, aplicándose en cada pozo 80 µg de proteína total tanto de la cepa como de las dos clonas.

Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento, los geles se incubaron en 250 mL de Tritón X-100 al 2.5% (v/v) durante 1 h, para remover el exceso de

SDS y restaurar la actividad de las proteasas. Posteriormente, los geles se enjuagaron 3 veces con agua bidestilada para retirar el exceso de Tritón.

Para detectar las actividades proteolíticas presentes en los extractos solubles de los trofozoítos de *G. lamblia*, los geles se incubaron en amortiguador de acetatos pH 5.5 durante 12-16 h a 37°C y en agitación. Al término de este período, se volvieron a enjuagar con agua bidestilada y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 durante 45 min en agitación constante y a 37°C, para posteriormente retirar el exceso de colorante y llevar a cabo la decoloración con una solución de ácido acético al 10% (v/v)(Apéndice C) (Lockwood y cols., 1987).

5.- ANALISIS DENSITOMETRICO.

El análisis densitométrico de los geles se realizó empleando un analizador de imágenes Fotodyne (Modelo Fotoeclipse) acoplado a una computadora Macintosh. Los valores se calcularon en función del control (sin inhibidor).

6.- DETERMINACION DE LA VIABILIDAD Y DE LA ACTIVIDAD METABOLICA DE LA CEPA WB Y DE LAS CLONAS C5 Y C7.

La viabilidad de los trofozoítos y su capacidad metabólica tanto en la cepa WB como en las clonas C5 y C7 en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores de proteasas empleados, se determinó mediante el método de resiembra (Cedillo y cols., 1992) y el método colorimétrico de MTT (sal de tetrazolio: Bromuro de 4, 5 dimetiltiazol-2, 5 difeniltetrazolio), respectivamente (Cedillo y Muñoz, 1992). Para realizar estos ensayos se probaron los inhibidores a diferentes concentraciones: E- 64 (1, 5, 10, 100 y 500 μ M), Iodoacetamida (10, 25, 50, 100 y 500 μ M), PMSF (25, 50,

100, 500 y 1000 μM), TPCK (25, 50, 100, 250 y 500 μM), 1, 10-fenantrolina y EDTA (0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 100 mM).

Los trofozoítos se incubaron con cada uno de los distintos inhibidores seleccionados a las diferentes concentraciones durante 30 min a 37°C. Al término de la incubación, los trofozoítos se lavaron con ASF dos veces. En el caso del método de resiembra, 9×10^4 trofozoítos se colocaron en medio de cultivo fresco y se incubaron durante 48 h a 37°C, para posteriormente contarlos en una cámara de Neubauer. Para el método de MTT, los trofozoítos lavados con ASF, se incubaron con 1 mL de MTT (0.075% p/v) y 250 μL de PMS (Metasulfato de fenazina) (2.5 mg/mL) durante 45 min a 37°C. Al finalizar este tiempo los trofozoítos se lavaron dos veces con ASF y el paquete celular se resuspendió en 750 μL de isopropanol, para posteriormente centrifugarse a 3,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se leyó a 570 nm contra el blanco de reacción.

7.- CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES MDCK E IEC- 6.

Las células epiteliales de riñón de perro (MDCK) y de íleon de rata (IEC-6), se cultivaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 hasta formar una monocapa confluyente en medio de Eagle modificado por Dulbecco para hibridomas (D-MEM- Hyb) (Sigma, Chemical, M. O.C.o, U. S. A), adicionado con suero fetal de ternera al 10%(v/v) (Hyclone, USA). Además, se añadió al medio de cultivo glutamina (2 mM), insulina (10 U/mL), estreptomycin (10 mg/mL), penicilina (10,000 UI/mL) y anfotericina B (2.5 mg/L). Una vez formada la monocapa, ésta se tripsinizó y se realizó la cuantificación de las células. Posteriormente, se hicieron inóculos de 1.5×10^6 células de MDCK y 1.2×10^6 células de IEC-6 por botella de cultivo (NUNC, USA) en un volumen total de 5.0 mL de D-MEM-Hyb, haciéndose los cambios requeridos de medio de cultivo hasta obtener nuevamente una monocapa celular confluyente, a partir de la cual

se obtuvieron las células que se crecieron en microplacas de cultivo de 24 pozos (Falcon 3047, Becton Dickinson, Lab. U.S.A).

8.- ENSAYO DE ADHESION DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* A CELULAS EPITELIALES MDCK E IEC-6.

Los ensayos de adhesión de los trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa WB y las clonas C5 y C7 se llevaron a cabo sobre las monocapas confluentes de células MDCK e IEC-6. En microplacas de cultivo de 24 pozos se colocaron 1.2×10^5 células de la línea MDCK y 1×10^5 células de la línea IEC-6 y se mantuvieron en cultivo hasta obtener monocapas confluentes. Por otro lado, los trofozoítos cosechados en la fase logarítmica de crecimiento se marcaron con $2 \mu\text{Ci/mL}$ de timidina tritiada (Amersham, U. S. A) y se incubaron durante 48 h a 37°C para la incorporación de timidina y se cosecharon mediante enfriamiento de los tubos durante 1 h. Posteriormente, los trofozoítos se lavaron dos veces con D-MEM-Hyb sin suero y se cuantificaron. Los trofozoítos (1.3×10^6) se incubaron previamente con cada uno de los inhibidores seleccionados: E-64 (0.001 mM), 1,10-fenantrolina (0.1 mM), PMSF (0.01 mM) y TPCK (0.1 mM) por 30 min a 37°C . Posteriormente, los trofozoítos se lavaron 3 veces con ASF y incubaron con las células epiteliales por 2 h. a 37°C .

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo se retiró y se colectó en papel Whatman No.3. A su vez, las monocapas junto con los trofozoítos adheridos se obtuvieron mediante su congelación a -70°C y $200 \mu\text{L}$ de tripsina y se colectaron asimismo en papel Whatman No. 3. Los papeles se secaron en un horno a 150°C durante 10 min y las proteínas se precipitaron en ácido tricloroacético al 10% durante 15 min, para posteriormente enjuagarlos con ácido tricloroacético al 5% y etanol. Nuevamente los papeles se secaron y se colocaron en una mezcla de centelleo que contenía PPO (2, 5-Difeniloxazol) (Mallinckrodt, U. S. A) y POPOP (p-bis[2- (5- feniloxazolil)]- benceno) en tolueno para ser leídos en un contador de centelleo (Minaxi β Tri-carb 4000 series).

La suma de las lecturas (cpm) de las células no adheridas (sobrenadantes) y células adheridas, se consideró como el número de cpm totales (células totales). Las cpm totales se calcularon para el control como para cada uno de los inhibidores y estos valores se emplearon en cada caso para el cálculo del porcentaje de inhibición de la adhesión. El porcentaje de inhibición de la adhesión se obtuvo siguiendo la fórmula:

$$\% \text{ inhibición de la adhesión} = \frac{\text{cpm no adheridas}}{\text{cpm totales}} \times 100$$

Finalmente, los porcentajes de células no adheridas obtenidos en el control se restaron de los valores de inhibición de la adhesión obtenidos con cada una de las muestras. Estas determinaciones se realizaron seis veces por duplicado cada una y los resultados mostrados son el promedio de éstas.

9.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* DESPUES DE LA INTERACCION CON CELULAS MDCK E IEC-6.

Para analizar la secreción de proteasas por *G. lamblia*, 1.3×10^6 trofozoítos de la cepa WB y de la clona C7, se incubaron con la línea celular epitelial IEC-6 (1×10^5) y la cepa WB también se incubó con la línea celular MDCK (1.2×10^5) por 2 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los sobrenadantes se colectaron y se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.22 µm para tener la seguridad de la ausencia de trofozoítos en la muestra y se concentraron 20 veces por medio de un sistema de ultrafiltración Centriprep con poro de exclusión de 10 kDa (Amicon, U. S. A). Los concentrados se 0.2%. Como controles se analizaron tanto el medio D-MEM solo como el medio en el cual se incubaron los trofozoítos solos o las líneas celulares solas.

IV. RESULTADOS

- ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS SOLUBLES DE LA CEPA WB Y DE LAS CLONAS C5 Y C7.

Los extractos solubles de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 se obtuvieron de acuerdo a lo descrito por Alvarado (1994). El análisis electroforético de los extractos mostró la presencia de aproximadamente 30 bandas con pesos moleculares entre 20-200 kDa (**Figura 2**). También se observó la presencia de una molécula proteica de aproximadamente 200 kDa en los extractos solubles de la cepa WB y de la clona C5 (carril 1 y 2).

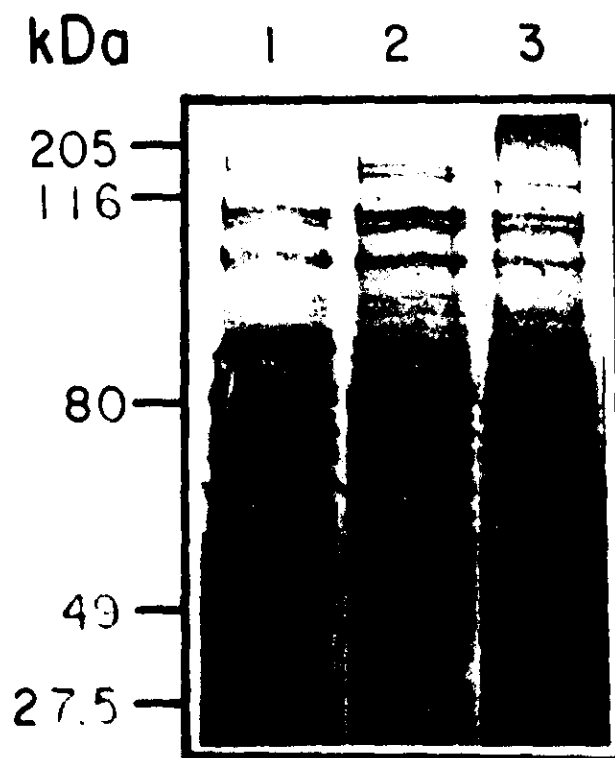


Figura 2. Análisis electroforético de los extractos solubles obtenidos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Los extractos solubles de la cepa WB (carril 1), de la clona C5 (carril 2) y de la clona C7 (carril 3), fueron obtenidos empleando sacarosa 0.25 M, Tritón X-100 al 0.25% y amortiguador de muestra 5X, mediante agitación con pipeta. En este análisis se emplearon 100 μ g de proteína total de cada uno de ellos y se separaron en gels de poliacrilamida-SDS al 10% bajo condiciones reductoras. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de la figura.

- ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES DEL METODO COLORIMETRICO EMPLEANDO AZOCASEINA COMO SUSTRATO.

- Cantidad de proteína

La determinación cuantitativa de la actividad y tipo de proteasas presentes en la cepa y en las dos clonas de *G. lamblia*, se realizó mediante un método colorimétrico empleando como sustrato azocaseína al 2% (Beynon y Butler, 1994). Inicialmente, se determinó la concentración de proteína de los extractos solubles a la cual se podían realizar los ensayos sin saturar la actividad de las proteasas (**Figura 3**). Así, se determinó que en nuestro sistema se podía realizar la cuantificación de actividad de proteasas en el intervalo de 40-100 μg de proteína total.

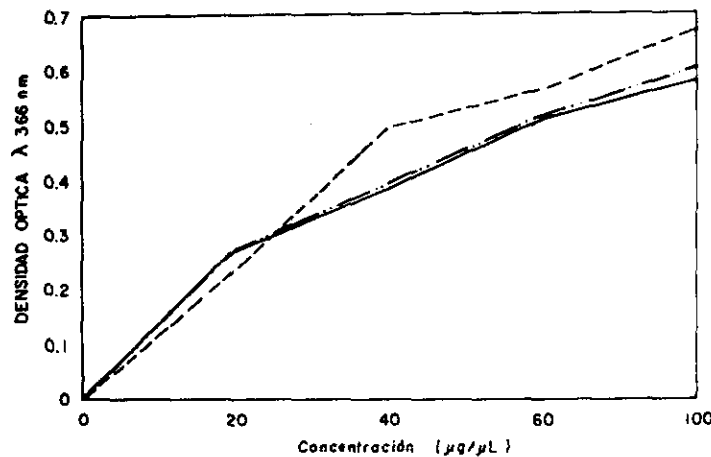


Figura 3. Valores de densidad óptica obtenidos empleando un método colorimétrico con azocaseína (2%) como sustrato. En la estandarización del método se emplearon diferentes concentraciones de proteína (20-100 μg) de los extractos solubles de trofozoitos de la cepa WB (—), de las clonas C5 (-.-.-) y C7 (—) de *G. lamblia*.

- Valor óptimo de pH.

En el análisis se llevó a cabo una curva de pH para encontrar el o los valor(es) de pH óptimo(s) para determinar la(s) actividad(es) proteolítica(s) de los lisados. Para esto, se empleó un amortiguador de tris-glicina, el cual permite trabajar en un intervalo de pH de 3-8, además de EDTA y cisteína (**Figura 4**). Así, los valores máximos de actividad para la cepa WB se obtuvieron a pH 4 y 5.6, para la clona C5 a pH de 5.6 y para la clona C7 a pH 5.4 y 5.6. Los picos de actividad alcanzaron un valor de absorbancia de 0.9 y 1.1 para la cepa WB, de 0.95 para la clona C5 y de 0.85 y 0.9 para la clona C7.

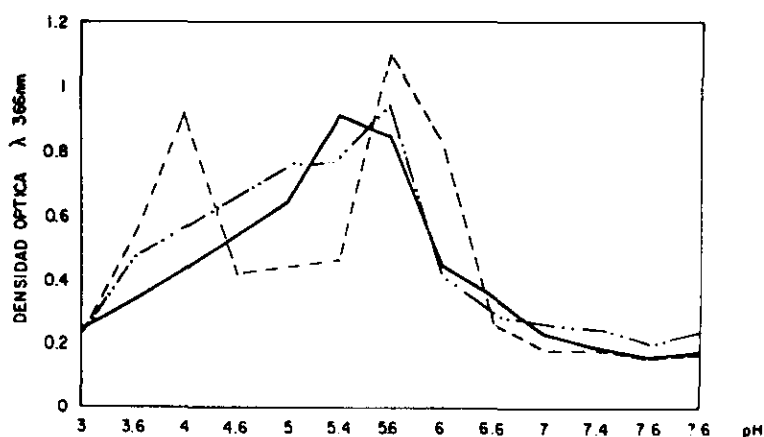


Figura 4. Valores de densidad óptica obtenidos empleando un método colorimétrico con azocaseína (2%) como sustrato a diferentes valores de pH. La actividad proteolítica se determinó con 100 μ g de proteína total de los extractos solubles de WB (—) y de las clones C5 (.....) y C7 (-.-.-). En este ensayo se utilizó amortiguador tris-glicina en presencia de EDTA y cisteína para determinar el valor óptimo de pH.

Posteriormente, se realizó una determinación de la actividad proteolítica a diferentes valores de pH, pero sin la presencia de EDTA ni cisteína, componentes que normalmente se encuentran en el regulador activado y que se omitieron con el objeto de detectar la actividad de diferentes tipos de proteasas que se encuentran presentes en el parásito, ya que el EDTA inhibe a las proteasas de tipo metalo y la cisteína activa a las de tipo cisteína. En este ensayo se observó que a pH de 5.6 tanto la cepa WB como las clonas C5 y C7 tuvieron la máxima actividad proteolítica, obteniéndose valores de densidad óptica de 1.2, 1.16 y 0.8, respectivamente (Figura 5).

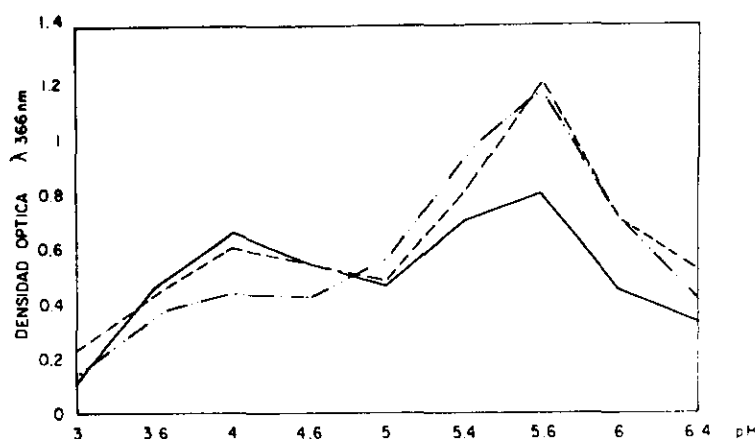


Figura 5. Valores de densidad óptica obtenidos empleando un método colorimétrico con azocaseína (2%) como sustrato. La determinación se llevó a cabo a diferentes valores de pH en ausencia de EDTA y cisteína. Se utilizaron 100 μ g de proteína total de los extractos solubles de la cepa WB (—) y de las clonas C5 (- - -) y C7 (- · - ·).

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, se determinaron como condiciones óptimas: pH 5.5, temperatura de 37°C y 100 µg de proteína total de los extractos de la cepa WB, las clonas C5 y C7. Para trabajar a pH de 5.5 en todos los ensayos realizados posteriormente se utilizó amortiguador de acetatos sin activar (en ausencia de EDTA y cisteína). Con estas condiciones se obtuvieron valores de actividad proteolítica para WB de 1.2, para la clona C5 de 1.16 y para C7 de 0.80.

- **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN EXTRACTOS SOLUBLES DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* EMPLEANDO UN METODO COLORIMETRICO.**

Con la finalidad de determinar el tipo de proteasas presentes en los extractos solubles tanto de la cepa como de las dos clonas, se utilizaron los siguientes inhibidores: E-64 e Iodoacetamida para proteasas de tipo cisteína, PMSF, TPCK y Antipaina para las serina-proteasas, aunque estos también inhiben algunas proteasas de tipo cisteína; Pepstatina para las aspártico-proteasas y para las metalo-proteasas EDTA y 1,10-fenantrolina.

Los porcentajes de inhibición de la actividad proteolítica obtenidos para la cepa WB y las clonas C5 y C7 se presentan en la **Tabla 1**. Como puede observarse, con los inhibidores para proteasas de tipo cisteína (E-64), serina (PMSF) y metalo (1,10-fenantrolina) se inhibió del 26 al 30% de la actividad proteolítica presente en la cepa WB. En el caso de la clona C5, con el inhibidor TPCK y con PMSF se obtuvo un porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica del 42% y 21%, respectivamente. La inhibición con E-64 y 1,10-fenantrolina fue del 43% y 41%, respectivamente. Con la clona C7, se obtuvieron porcentajes de inhibición similares a los observados con la cepa WB, con la diferencia de que en el caso de la clona C7, EDTA inhibió el 30%. Los demás inhibidores empleados inhibieron la actividad proteolítica de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 entre 0 y 18%.

Por otro lado, cuando se emplearon los inhibidores E-64, TPCK y 1,10-fenantrolina a las concentraciones de 1 mM, 0.33 mM y 1 mM, respectivamente, **(Tabla 2)** se obtuvieron en el caso de WB, porcentajes de inhibición mayores que los obtenidos con los mismos inhibidores a las concentraciones de 10 μ M (E-64), 1 mM (TPCK) y 10 mM (1,10-fenantrolina) **(Tabla 1)**. Asimismo, con la clona C7 se observaron porcentajes de inhibición mayores cuando se emplearon E-64 y TPCK, sin embargo con 1,10-fenantrolina el porcentaje de inhibición se redujo a 19. La inhibición de actividad de proteasas de la clona C5 a las mismas concentraciones, se vió ligeramente aumentada con E-64 y TPCK pero con 1,10-fenantrolina se obtuvo un porcentaje de inhibición del 26, siendo menor que el obtenido con este inhibidor a una concentración de 10 mM **(Tabla 1)**.

Tabla 1. Determinación de la actividad proteolítica en extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas.

INHIBIDOR (concentración)	CEPA WB		CLONA C5		CLONA C7	
	AE±ES	% inhibición	AE±ES	% inhibición	AE±ES	% inhibición
Control	0.982 ± 0.02	0	0.900 ± 0.01	0	0.73 ± 0.005	0
E-64 (10 µM)	0.786±0.003	29	0.513±0.02	43	0.526±0.01	28
IAA (100 µM)	0.919±0.008	7	0.837±0.008	7	0.584±0.02	20
PMSF (1 mM)	0.727±0.004	26	0.711±0.006	21	0.600±0.02	18
TPCK (1 mM)	0.854±0.006	13	0.522±0.003	42	0.630±0.02	14
Antipaina (100 µM)	0.825±0.007	16	0.720±0.002	20	0.672±0.03	8
Pepstatina (1µM)	0.953±0.003	3	0.864±0.002	4	0.716±0.06	26
1,10-ph (10 mM)	0.705±0.005	30	0.631±0.005	41	0.533±0.05	27
EDTA (10 mM)	0.852±0.005	15	0.946±0.003	6	0.511±0.08	30

Los extractos solubles (100 µg de proteína) de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 se incubaron en presencia de diferentes inhibidores de proteasas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. La actividad proteolítica se determinó mediante un ensayo colorimétrico empleando azocaseína al 2%. El porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica con los diferentes inhibidores se determinó con respecto al control. AE= actividad específica ; ES=error estándar. IAA = Iodoacetamida. 1, 10 ph = 1,10-fenantrolina.

Tabla 2. Determinación de la actividad proteolítica en extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas.

INHIBIDOR (Concentración)	CEPA WB		CLONA C5		CLONA C7	
	AE±ES	% inhibición	AE±ES	% inhibición	AE±E.S	% inhibición
E-64 (1 mM)	0.478±0.008	56	0.460±0.001	49	0.460±0.005	37
TPCK (0.33mM)	0.520±0.002	47	0.486±0.004	46	0.504±0.004	31
1,10-ph (1 mM)	0.538±0.006	47	0.77±0.003	25	0.590±0.008	19

Los extractos solubles (100 µg de proteína) de la cepa WB y las clonas C5 y C7 se incubaron en presencia de E-64, TPCK y 1,10-fenantrolina empleando las concentraciones de cada uno de ellos descritas por Williams y Coombs (1995). La actividad proteolítica se determinó mediante un ensayo colorimétrico empleando azocaseína al 2%. El porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica con los diferentes inhibidores se determinó con respecto al control.

A.E=Actividad específica;E.S= Error estándar; 1,10 ph= 1,10-fenantrolina.

- **CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* MEDIANTE GELES PAGE-SDS COPOLIMERIZADOS CON GELATINA.**

Por otro lado, con la finalidad de caracterizar la actividad proteolítica presente en los extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7, se realizaron geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina y se emplearon seis inhibidores de proteasas, los cuales mediante el método colorimétrico se observó que tuvieron efecto sobre la actividad proteolítica de los trofozoitos de *G. lamblia*.

En el análisis electroforético de los extractos solubles de la cepa WB se observó un patrón proteolítico de siete bandas de actividad con pesos moleculares de 19, 60, 74, 95, 100, 110 y 160 kDa y en el caso de la clona C5 de 19, 55, 64, 80, 95, 110 y 180 kDa. Con respecto a la clona C7 se observaron cuatro bandas con actividad proteolítica con pesos moleculares 80, 91, 100 y 126 kDa (**Figuras 6, 7 y 8, carril 1**).

El análisis densitométrico reveló que cuando el extracto soluble de la cepa WB se incubó en presencia de E-64 (**Figura 6, carril 2**) hubo 100% de inhibición de la actividad proteolítica de la banda de mayor peso molecular (160 kDa) y las bandas de 95 y 100 kDa disminuyeron en intensidad 60 y 65%, respectivamente. En el caso de Iodoacetamida, hubo desaparición total de las bandas de 19 y 60 kDa, además, se detectó una inhibición del 75% en la banda de 160 kDa, del 73% en la banda de 100 kDa y del 70% en las bandas de 74 y 95 kDa (**Figura 6, carril 3**). En el caso de PMSF (**Figura 6, carril 4**) las 7 bandas de actividad proteolítica disminuyeron en intensidad entre 82 y 98%. En presencia de TPCK (**Figura 6, carril 5**) las bandas con actividad proteolítica con pesos moleculares de 19, 60 y 74 kDa mostraron una inhibición del 100%, 63% y 58%, respectivamente, las demás bandas no se

vieron muy afectadas. Además, con TPCK aparece una banda de alto peso molecular de aproximadamente 150 kDa. En el caso de inhibidores de metaloproteasas, específicamente con 1,10-fenantrolina (**Figura 6, carril 6**) la banda que apareció al emplear TPCK (150 kDa), también aparece con este inhibidor y hay desaparición de las bandas de peso molecular de 19, 60 y 74 kDa; además la banda de 160 kDa se inhibió un 91%. En presencia de EDTA (**Figura 6, carril 7**) la banda de 150 kDa que apareció bajo estímulo de TPCK y 1,10-fenantrolina desapareció. Las bandas de 160 y 19 kDa fueron principalmente inhibidas disminuyendo su intensidad un 98 y 77% respectivamente. Es importante resaltar que con los inhibidores PMSF, TPCK y 1,10-fenantrolina aparece una banda con actividad proteolítica de 23 kDa. Los porcentajes de inhibición de las actividades proteolíticas de la cepa WB en presencia de los inhibidores se resumen en la **Tabla 3**.

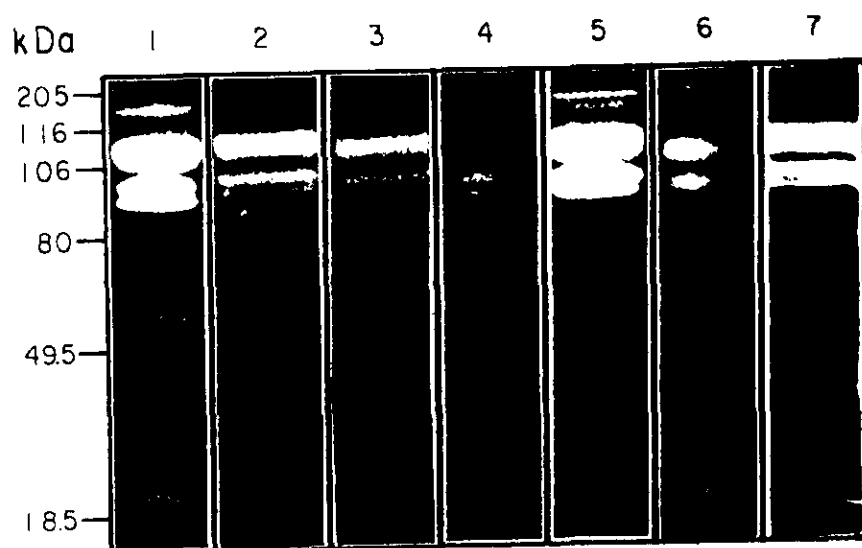


Figura 6. Análisis electroforético del extracto soluble de trofozoítos de la cepa WB de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. El extracto soluble de la cepa WB (carril 1) se preincubó con los inhibidores E-64 (carril 2), Iodoacetamida (carril 3), PMSF (carril 4), TPCK (carril 5), 1,10 fenantrolina (carril 6) y EDTA (carril 7) durante 30 min a 37°C. Posteriormente los extractos se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% copolimerizados con gelatina al 0.2% y se revelaron con amortiguador de acetatos pH 5.5. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de la figura.

Tabla 3. Análisis densitométrico de la inhibición (%) de la actividad proteolítica de los extractos solubles de la cepa WB en presencia de diferentes inhibidores de proteasas.

BANDA DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA (kDa)	E-64	IAA	PMSF	TPCK	1,10 ph	EDTA
160	100	75	82	20	91	98
110	20	52	96	0	66	16
100	65	73	82	6	70	25
95	60	70	89	3	79	30
74	21	70	90	58	100	45
60	41	100	85	63	100	22
19	52	100	98	100	99	77

Los extractos solubles de la cepa WB se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina al 0.2% y las bandas de actividad proteolítica se evaluaron mediante el empleo de un analizador de imágenes Fotodyne (Modelo Fotoeclipse) acoplado a una computadora Macintosh..
 IAA: Iodoacetamida, 1,10 ph: 1,10-fenantrolina.

Con respecto a la incubación del extracto soluble obtenido de la clona C5 con los diferentes inhibidores, el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina mostró que en presencia de E-64 las bandas con pesos moleculares de 95, 110 y 180 kDa se inhibieron 100%, 100% y 94%, respectivamente (**Figura 7, carril 2**). Las demás bandas de actividad disminuyeron su actividad entre 68 y 88%. Cuando se empleó Iodoacetamida, se observó que las bandas presentes disminuyeron en intensidad entre: 34-79% y únicamente la banda de 19 kDa disminuyó su actividad en un 96% (**Figura 7, carril 3**). Con PMSF, únicamente se detectó disminución en la intensidad de las bandas de 110 y 180 kDa, correspondiendo al 74% y al 96% de inhibición respectivamente (**Figura 7, carril 4**), las demás bandas no fueron afectadas por el inhibidor. En presencia de TPCK, las bandas de 95, 110 y 180 disminuyeron en intensidad en un 98-99% (**Figura 7, carril 5**) las otras bandas de actividad proteolítica fueron inhibidas entre 16 y 63%. Con el inhibidor 1,10-fenantrolina (**Figura 7, carril 6**), principalmente se observó 60% de inhibición en la intensidad de la banda de 64 kDa y un 45% en la banda de 55 kDa. Por último, con EDTA se detectó disminución en la intensidad de la banda de 19 kDa en un 88% (**Figura 7, carril 7**) y las otras bandas no mostraron una inhibición significativa. Estos resultados se resumen en la **Tabla 4**.

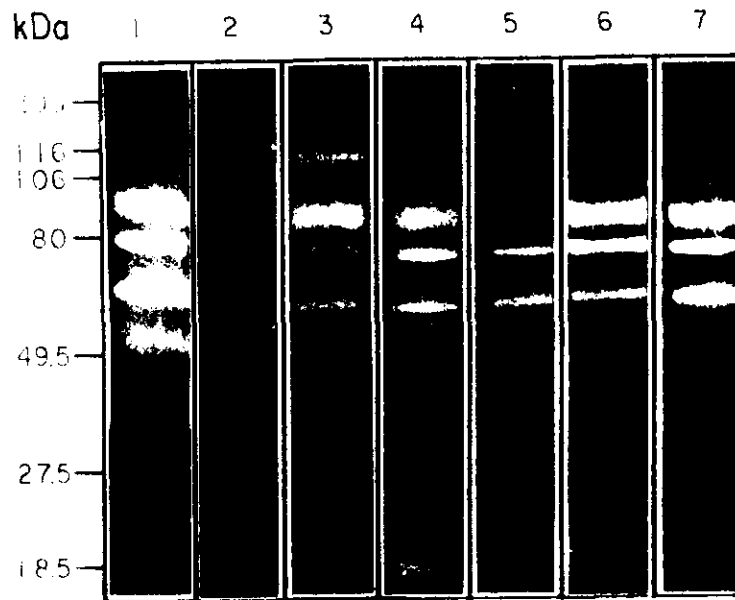


Figura 7. Análisis electroforético del extracto soluble de trofozoítos de la clona C5 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. El extracto soluble de la clona C5 (carril 1) se preincubó con los inhibidores E-64 (carril 2), Iodoacetamida (carril 3), PMSF (carril 4), TPCK (carril 5), 1,10-fenantrolina (carril 6) y EDTA (carril 7) durante 30 min a 37°C. Posteriormente los extractos se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% copolimerizados con gelatina al 0.2% y se revelaron con amortiguador de acetatos pH 5.5. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de la figura.

Tabla 4. Análisis densitométrico de la inhibición (%) de la actividad proteolítica del extracto soluble de la clona C5 en presencia de diferentes inhibidores de proteasas.

BANDA ACTIVIDAD PROTEOLITICA (kDa)	E-64	IAA	PMSF	TPCK	1,10 ph	EDTA
180	94	72	96	99	10	0
110	100	60	74	98	0	16
95	100	34	0	98	8	5
80	88	71	0	63	15	25
64	68	42	0	40	60	10
55	83	79	0	16	45	34
19	84	96	0	40	3	88

Los extractos solubles de la clona C5 se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina al 0.2% y las bandas de actividad proteolítica se evaluaron mediante el empleo de un analizador de imágenes Fotodyne (Modelo Fotoeclipse) acoplado a una computadora Macintosh.

IAA: Iodoacetamida, 1,10 ph: 1,10-fenantrolina.

Por otro lado, el análisis densitométrico del extracto soluble obtenido de la clona C7 reveló que en presencia de E-64 (**Figura 8, carril 2**) desaparecieron completamente las 4 bandas de actividad proteolítica, en cambio cuando se empleó Iodoacetamida disminuyeron en intensidad las bandas de 91 y 100 kDa en 83 y 85%, respectivamente, desapareciendo completamente la banda de 80 kDa (**Figura 8, carril 3**). Al emplear PMSF (**Figura 8, carril 4**) se observó inhibición únicamente en las bandas de 91 y 100 kDa en 76 y 81%, respectivamente; con TPCK el patrón de actividad proteolítica permaneció prácticamente sin cambio (**Figura 8, carril 5**). En presencia de 1,10-fenantrolina (**Figura 8, carril 6**) se detectó inhibición de la actividad proteolítica en las bandas de 80, 91 y 100 kDa (76, 41 y 79%, respectivamente); con respecto a EDTA, se detectó una ligera disminución en la intensidad de las 4 bandas, siendo del 14 al 30% (**Figura 8, carril 7**). Estos resultados se muestran en la **Tabla 5**.

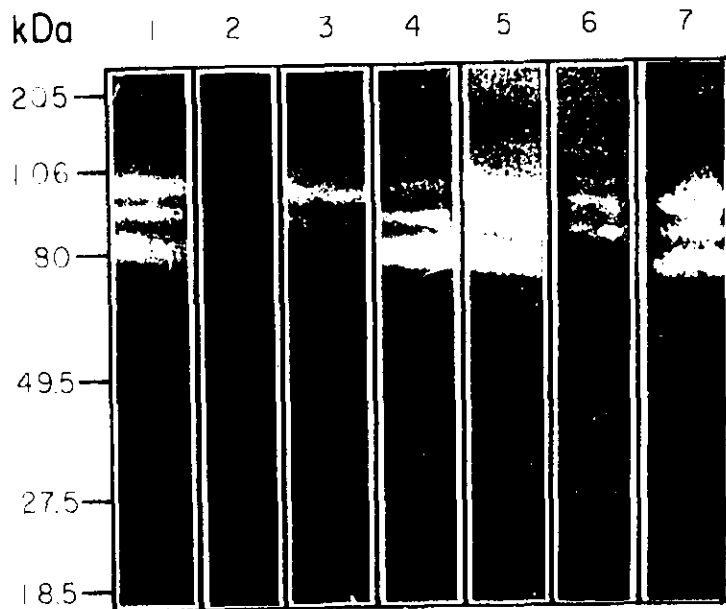


Figura 8. Análisis electroforético del extracto soluble de trofozoítos de la clona C7 de *G. lamblia* en presencia de diferentes inhibidores de proteasas. El extracto soluble de la clona C7 (carril 1) se incubó con los inhibidores E-64 (carril 2), Iodoacetamida (carril 3), PMSF (carril 4), TPCK (carril 5), 1,10-fenantrolina (carril 6) y EDTA (carril 7) durante 30 min a 37°C. Posteriormente los extractos se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10% copolimerizados con gelatina al 0.2% y se revelaron con amortiguador de acetatos. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de la figura.

Tabla 5. Análisis densitométrico de la inhibición (%) de la actividad proteolítica de los extractos solubles de la clona C7 en presencia de diferentes inhibidores de proteasas.

BANDA DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA (kDa)	E-64	IAA	PMSF	TPCK	1,10 ph	EDTA
126	100	0	0	0	0	30
100	100	85	81	8	79	19
91	100	83	76	10	41	10
80	100	100	0	0	76	14

Los extractos solubles de la clona C7 se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina al 0.2% y las bandas de actividad proteolítica se evaluaron mediante el empleo de un analizador de imágenes FOTODYNE (Modelo Fotoeclipse) acoplado a una computadora Macintosh.
IAA: Iodoacetamida, 1,10 ph: 1,10-fenantrolina.

- **DETERMINACION DEL EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA VIABILIDAD Y LA ACTIVIDAD METABOLICA DE LOS TROFOZOITOS DE LA CEPA WB Y DE LAS CLONAS C5 Y C7.**

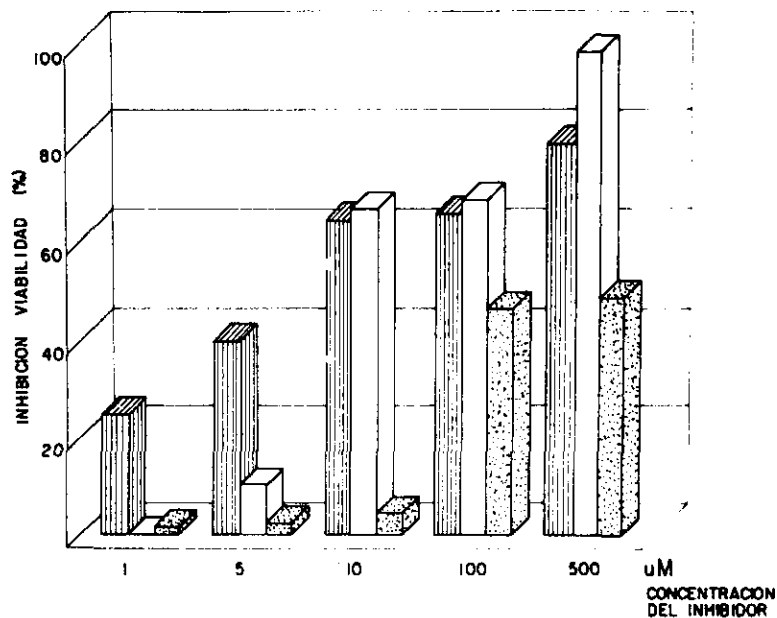
Se realizaron diferentes experimentos para determinar el efecto de los diferentes inhibidores de proteasas, a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad (**Figuras 9-11**) y actividad metabólica (**Figuras 12-14**) de los trofozoítos de la cepa WB, como de las clonas C5 y C7 empleando el método de resiembra y el método de MTT/PMS, respectivamente. Los resultados obtenidos en estos ensayos permitieron escoger las concentraciones de los diferentes inhibidores que no afectan la viabilidad de los trofozoítos para posteriormente emplearlos en los ensayos de adhesión de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 a las líneas celulares MDCK e IEC-6.

De manera general, en lo que respecta a la viabilidad, determinada por el método de resiembra, los resultados muestran que los inhibidores de cisteína evaluados (E-64 e Iodoacetamida) afectan de manera similar a la cepa WB y a la clona C5 (**Figuras 9a y 9b**), aunque en el caso de E-64, la cepa WB es más susceptible que la clona C5, aún a concentraciones bajas de este inhibidor. En relación con la clona C7, la viabilidad no se ve afectada de manera importante por E-64 a concentraciones de 10 μM y de Iodoacetamida de 50 μM y aún a concentraciones altas de ambos inhibidores C7 es menos susceptible que la cepa WB y la clona C5 (**Figuras 9a y 9b**).

En el caso del inhibidor para proteasas de tipo serina, PMSF (**Figura 10a**), la cepa WB muestra una susceptibilidad mayor que las clonas C5 y C7. Cuando se empleó TPCK (**Figura 10b**) la clona C5 se vió principalmente afectada aún a las concentraciones más bajas empleadas, sin embargo la clona C7 resultó marcadamente menos susceptible a la acción de este inhibidor.

En cuanto a los inhibidores de proteasas de tipo metalo se observó que tanto la cepa WB como las clonas C5 y C7 son susceptibles a 1,10-fenantrolina a partir de 1 mM (**Figura 11a y 11b**), sin embargo en el caso de EDTA, este inhibidor tiene menor efecto sobre la clona C5 a partir de 10 mM presentándose lo contrario para la cepa WB y la clona C7 (**Figura 11b**).

9a



9b

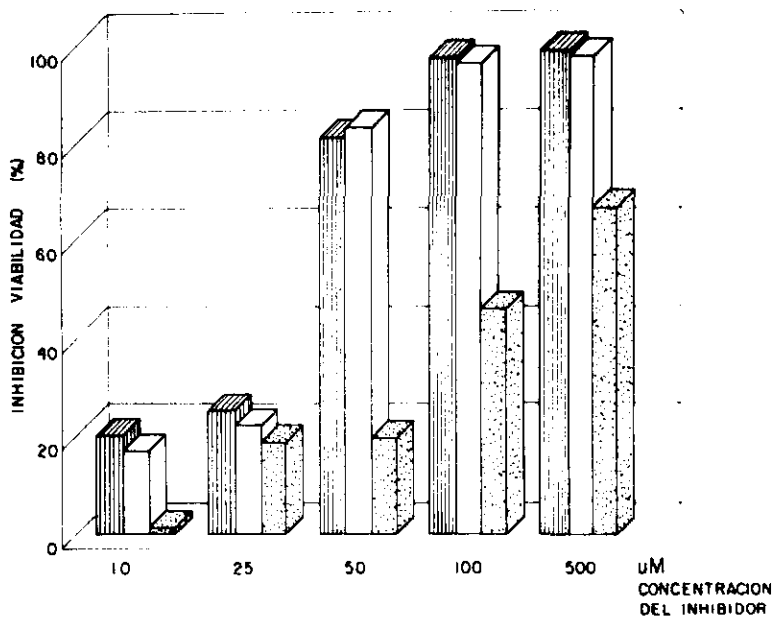
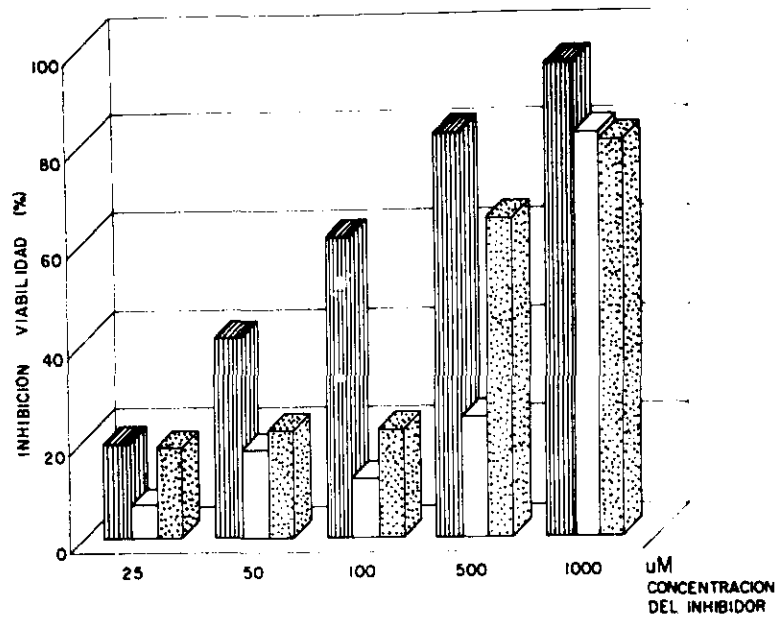


Figura 9. Determinación de la inhibición de la viabilidad de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Trofozoítos (9×10^4) de la cepa WB (barras con líneas verticales) y las clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) se pretrataron con los inhibidores E-64 (a) e Iodoacetamida (b) a diferentes concentraciones durante 30 min a 37°C. Posteriormente se lavaron y se incubaron en medio TYI-S-33 completo por 48 h a 37°C y se contaron en una cámara de Neubauer.

10a



10b

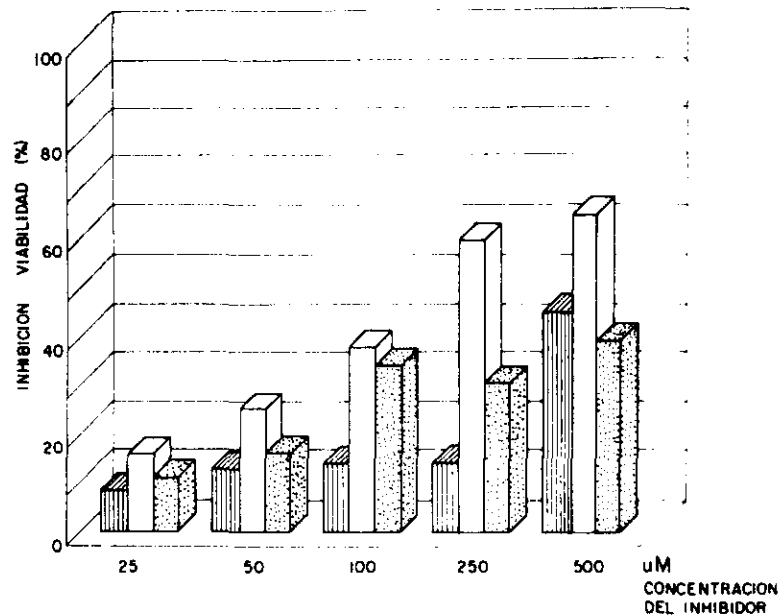
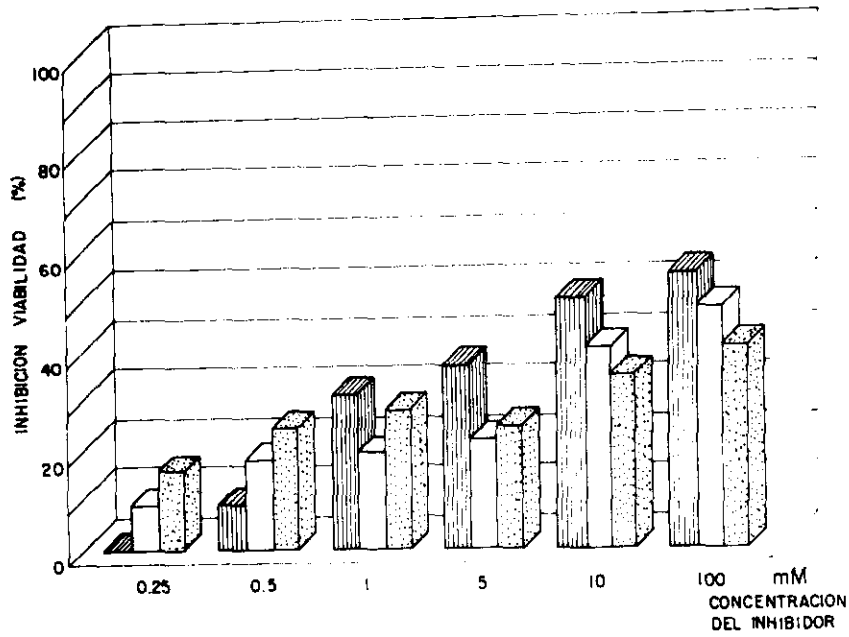


Figura 10. Determinación de la inhibición de la viabilidad de los trofozoitos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Trofozoitos (9×10^4) de la cepa WB (barras con líneas verticales) y las clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) se pretrataron con los inhibidores PMSF (a) y TPCK (b) a diferentes concentraciones durante 30 min a 37°C. Posteriormente se lavaron y se incubaron en medio TYI-S-33 completo por 48 h a 37°C y se contaron en una cámara de Neubauer.

11a



11b

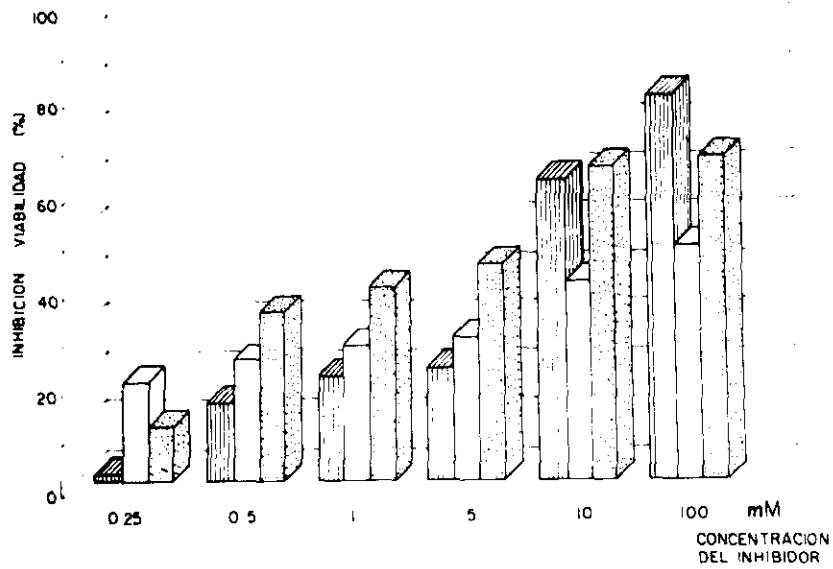
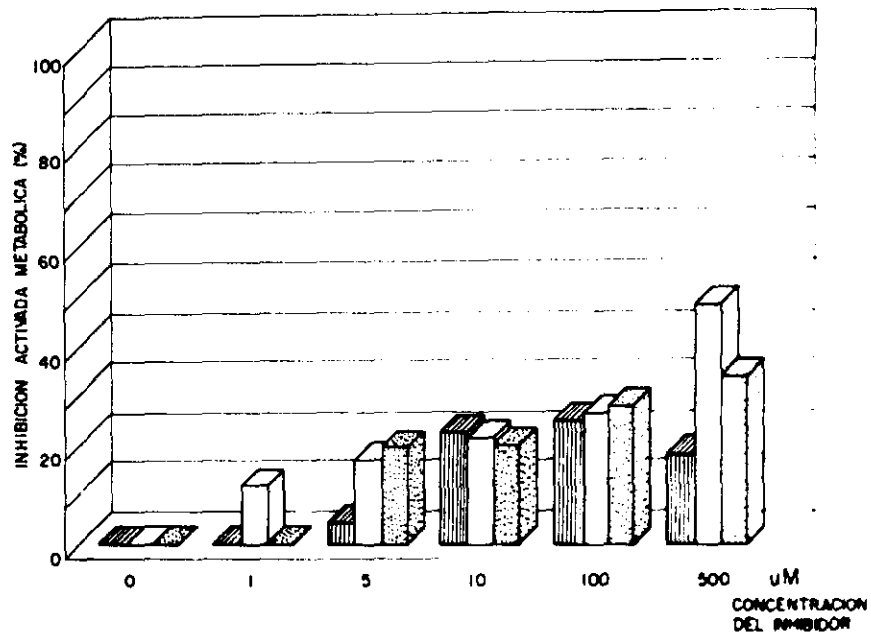


Figura 11. Determinación de la inhibición de la viabilidad de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Trofozoítos (9×10^4) de la cepa WB (barras con líneas verticales) y las clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) se pretrataron con los inhibidores 1,10-fenantrolina (a) y EDTA (b) a diferentes concentraciones durante 30 min a 37°C. Posteriormente se lavaron y se incubaron en medio TYI-S-33 completo por 48 h a 37°C y se contaron en una cámara de Neubauer.

Posteriormente, mediante el método de MTT/PMS se determinó la actividad metabólica de la cepa y las dos clonas con los mismos inhibidores empleados con anterioridad. De esta manera, cuando se utilizó el inhibidor para cisteína-proteasas E-64 (**Figura 12a**) se observó que tanto la cepa como las dos clonas mostraron una inhibición cercana al 20% aún a concentraciones de 10 μM . En el caso de las clonas C5 y C7 el máximo de inhibición se obtuvo a la concentración de 500 μM , siendo de 45 y 32% respectivamente, sin embargo los valores para WB se mantuvieron relativamente bajos (14%). En cuanto a Iodoacetamida (**Figura 12b**) a partir de 100 μM se obtuvo para la clona C5, un aumento en la inhibición de la actividad metabólica siendo esta del 88%. Sin embargo, la cepa WB y la clona C7, se vieron ligeramente inhibidas (23 y 10%, respectivamente).

12a



12b

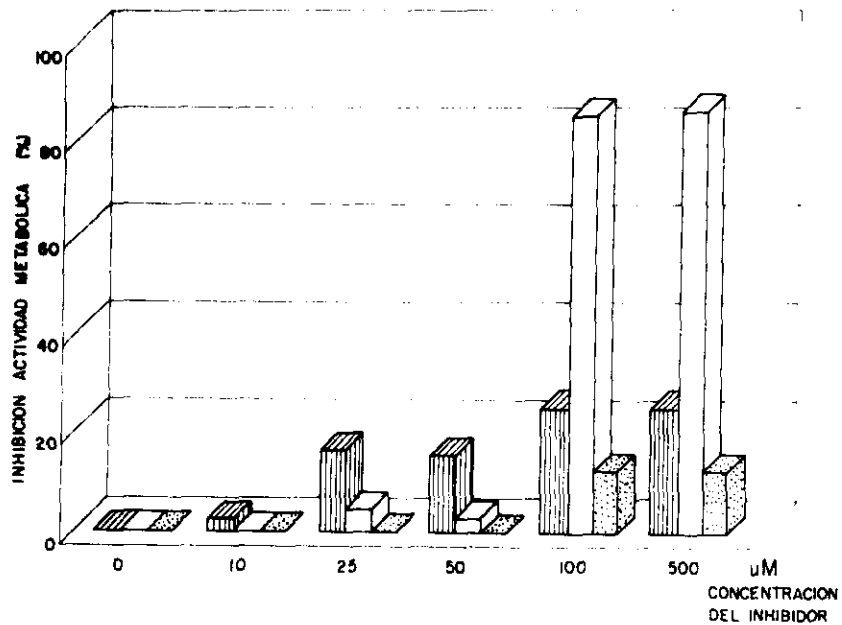
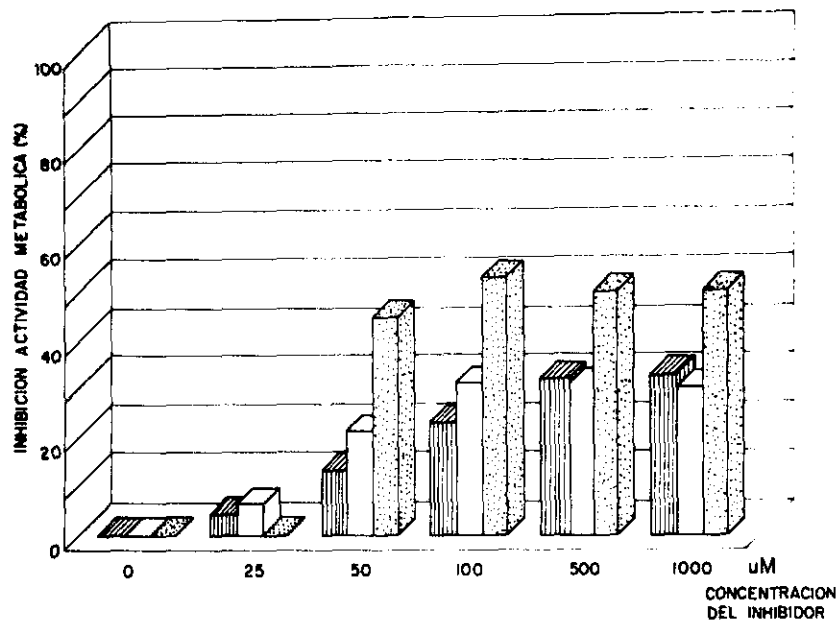


Figura 12. Determinación de la inhibición de la actividad metabólica de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Trofozoítos (1.5×10^5) de la cepa WB (barras con líneas verticales) y las clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) se incubaron con diferentes concentraciones de los inhibidores E-64 (a) e Iodoacetamida (b) y se analizó su actividad metabólica por el método de MTT/PMS como se describió en Materiales y Métodos.

Cuando se emplearon inhibidores para proteasas de tipo serina, se observó que en el caso específico del inhibidor PMSF (**Figura 13a**), la clona C7 a partir de concentraciones de 50 μ M mostró mayor susceptibilidad a este inhibidor (40% inhibición); en cambio, tanto la cepa WB como la clona C5 tuvieron un comportamiento similar y fueron menos susceptibles que la clona C7 (30% a la máxima concentración empleada). En el caso de TPCK (**Figura 13b**), la cepa WB fue la más susceptible al efecto del inhibidor, esta susceptibilidad aumentó a medida que aumentó la concentración del inhibidor alcanzándose más del 50% de inhibición con 500 μ M. Resulta interesante observar que en presencia de este inhibidor, la clona C7 no se vió afectada de manera considerable aún a una concentración de 500 μ M (16% inhibición); sin embargo, a esta misma concentración se obtuvo un 40% de inhibición para la clona C5. En especial con este inhibidor se observaron diferencias marcadas entre la cepa WB y la clona C5 con respecto a la clona C7.

13a



13b

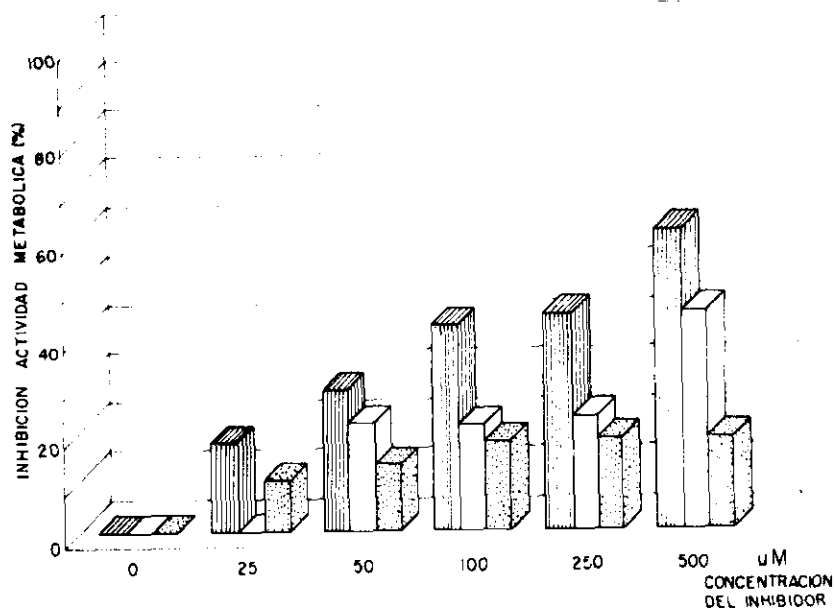
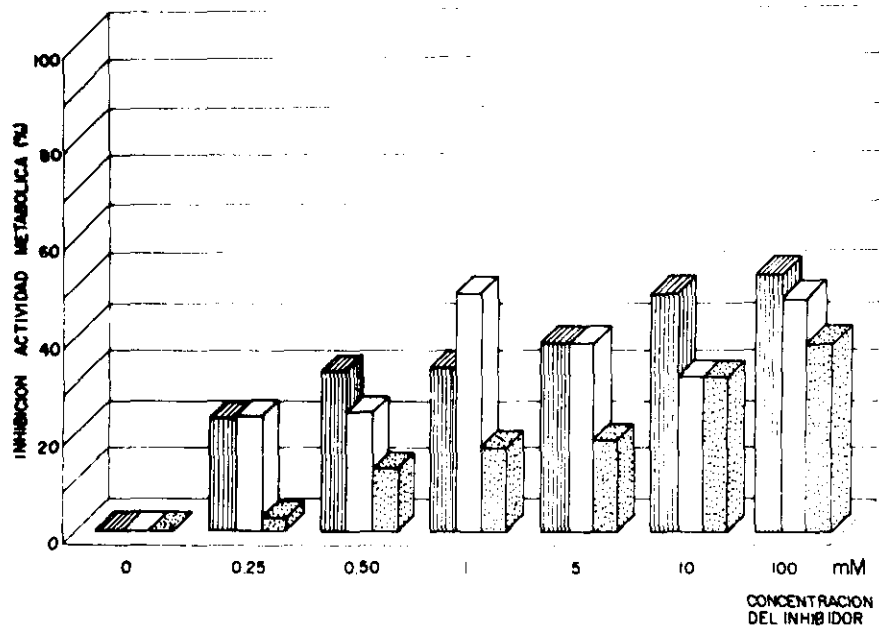


Figura 13. Determinación de la inhibición de la actividad metabólica de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Trofozoítos (1.5×10^5) de la cepa WB (barras con líneas verticales) y las clonas C5 (barras blancas) y la clona C7 (barras punteadas) se incubaron con diferentes concentraciones de los inhibidores PMSF (a) y TPCK (b) y se analizó su actividad metabólica por el método de MTT/PMS como se describió en Materiales y Métodos.

Por otro lado, cuando se utilizaron inhibidores para proteasas de tipo metalo se observó que con 1,10-fenantrolina (**Figura 14a**) WB y C5 tuvieron más del 20% de inhibición a partir de 0.50 mM. La clona C7 mostró ser menos susceptible a este inhibidor obteniéndose alrededor del 35% de inhibición con la máxima concentración empleada. Con respecto al inhibidor EDTA (**Figura 14b**) se obtuvieron en términos generales mayores porcentajes de inhibición de la actividad metabólica que con 1,10-fenantrolina. Así, las clonas C5 y C7 mostraron mayor susceptibilidad a éste, ya que desde 0.50 mM se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores de 30. En el caso de la cepa WB, se observó a partir de 10 mM un aumento en el porcentaje de inhibición de la actividad metabólica, alcanzándose 42% a la máxima concentración probada. En lo que respecta a la clona C7, se observó que aún a concentraciones bajas se obtuvo un porcentaje de inhibición de 36, para alcanzar un 47% cuando se empleó 1 mM del inhibidor y no se observó gran variación a medida que se aumentó la concentración.

14a



14b

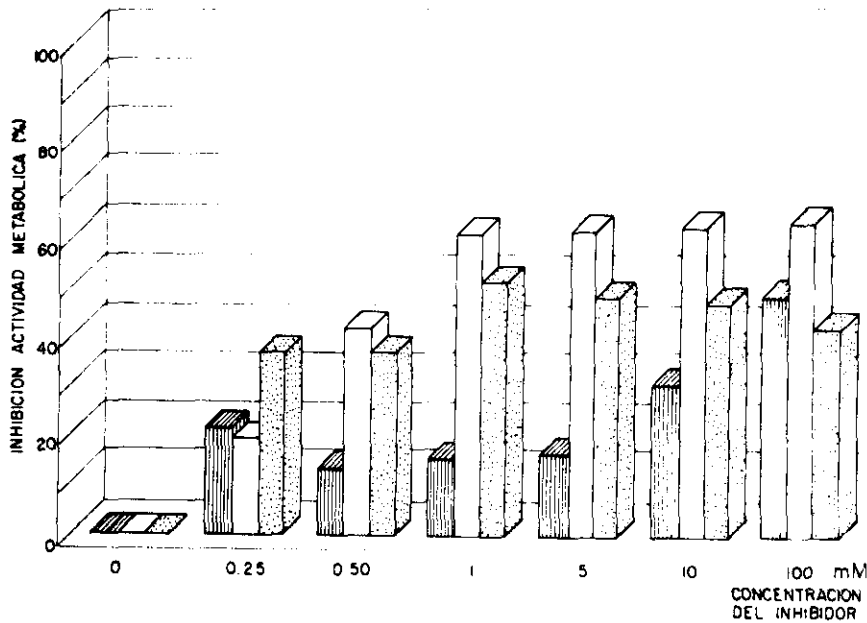


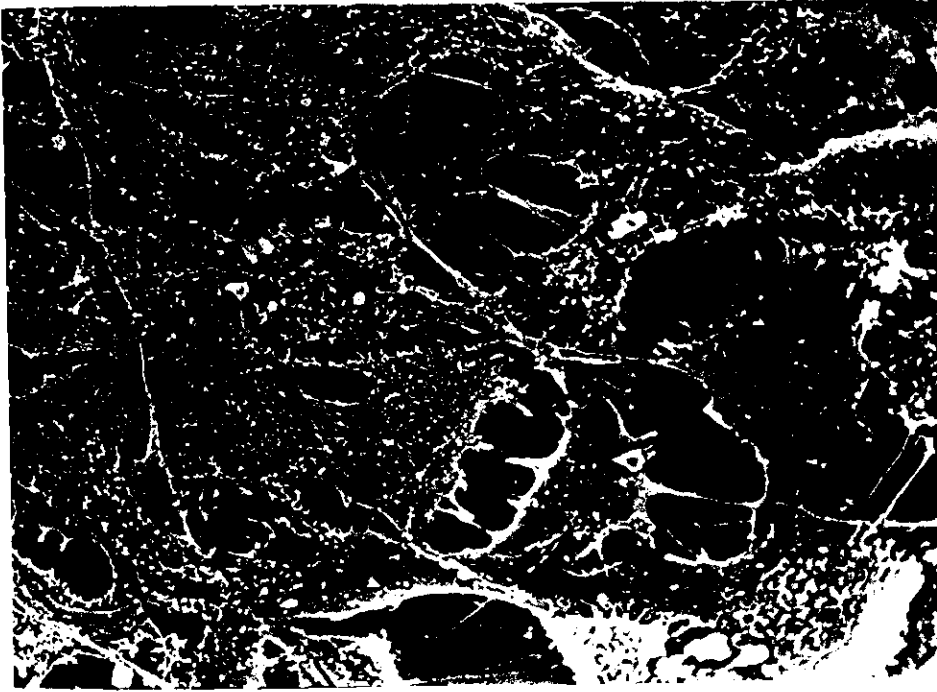
Figura 14. Determinación de la inhibición de la actividad metabólica de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia*. Trofozoítos (1.5×10^5) de la cepa WB (barras con líneas verticales) y de las clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) se incubaron con diferentes concentraciones de los inhibidores 1,10-fenantrolina (a) y EDTA (b) y se analizó su actividad metabólica por el método de MTT/PMS como se describió en Materiales y Métodos

- **ENSAYO DE INHIBICION DE LA ADHESION DE TROFOZOITOS DE LA CEPA WB Y DE LAS CLONAS C5 Y C7 DE *G. lamblia* A LAS LINEAS CELULARES MDCK E IEC-6.**

Una vez caracterizada la actividad proteolítica presente en la cepa WB y las clonas C5 y C7, se procedió a realizar ensayos de citoadherencia de los trofozoítos a las líneas celulares MDCK e IEC-6 (**Figuras 15 y 16**). Los valores de eficiencia de adhesión para la cepa WB y las clonas C5 y C7 a la línea celular IEC-6 fueron: 82%, 80% y 31%, respectivamente; en el caso de la línea celular MDCK fueron: 80%, 80% y 30%, respectivamente.

Con la finalidad de evaluar el efecto de los inhibidores de proteasas sobre la adhesión de los trofozoítos a MDCK e IEC-6, se seleccionaron los inhibidores que mostraron tener efecto sobre las proteasas de *G. lamblia*. Así, los inhibidores empleados fueron: E-64, Iodoacetamida, PMSF, TPCK, 1,10-fenantrolina y EDTA. Para la estandarización del método se evaluaron tres diferentes concentraciones de cada uno de los inhibidores (0.001, 0.01 y 0.1 mM) basándose en resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y actividad metabólica de la cepa y las dos clonas en presencia de los diferentes inhibidores. En cada ensayo de citoadherencia se determinó la viabilidad de los trofozoítos después de la incubación con cada uno de los inhibidores, llevándose a cabo posteriormente la adhesión a las líneas celulares.

a



b

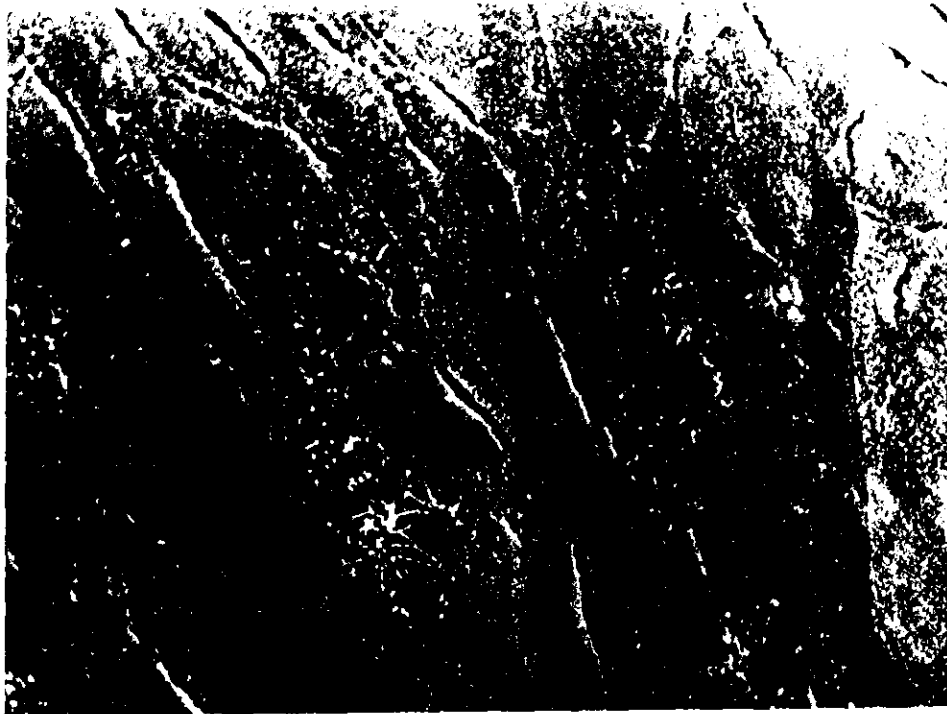
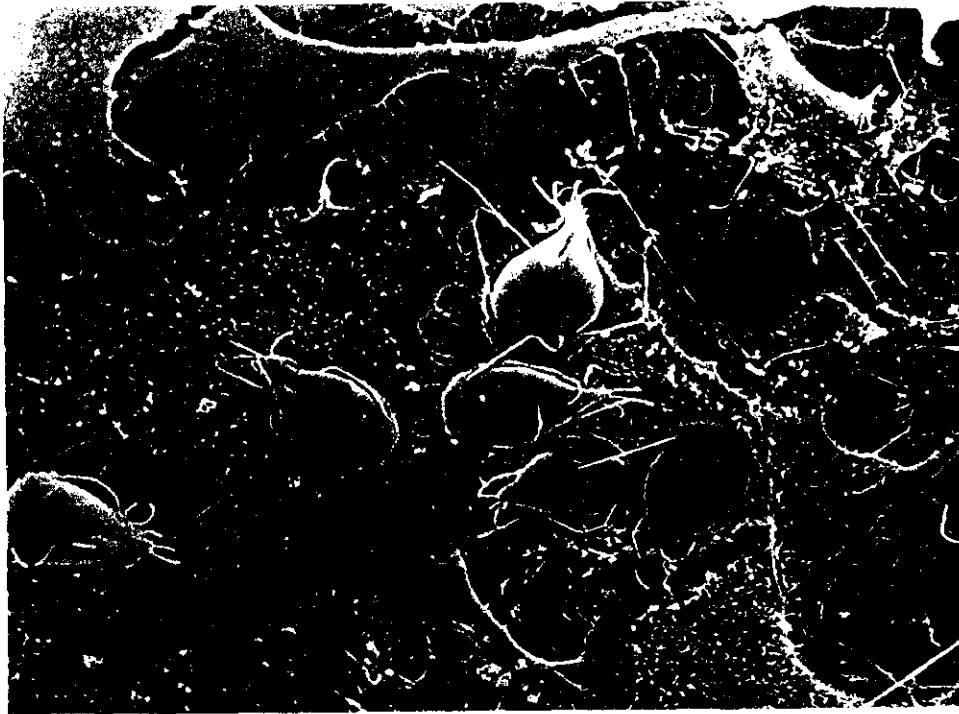


Figura 15. Microfotografía de las líneas celulares IEC-6 y MDCK. Las líneas IEC-6 (a) y MDCK (b) fueron tomadas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido a un aumento de 1000 y 720, respectivamente. Las microfotografías fueron realizadas por el Dr. Arturo González, Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN .

a



b

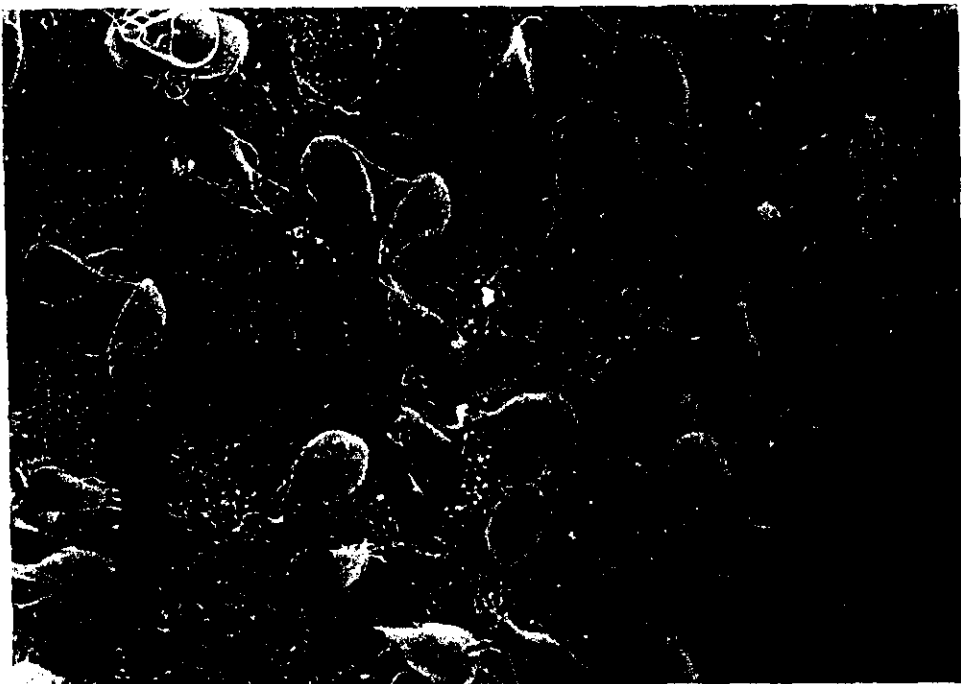


Figura 16. Microfotografía de las líneas celulares IEC-6 y MDCK en interacción con trofozoítos de la clona C5 de *G. lamblia*. Las líneas celulares IEC-6 (a) y MDCK (b) se tomaron a un aumento de 1200 y 1500, respectivamente, mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido. Las microfotografías realizadas por el Dr. Arturo González, Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN .

Una vez que se estandarizaron las condiciones del ensayo de adhesión, se seleccionaron aquellos inhibidores y concentraciones con los que se obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición de la adhesión, considerando que la viabilidad (método de resiembra) de los trofozoítos no fuera menor del 80%. De esta forma, las concentraciones y los inhibidores seleccionados fueron: 0.001 mM para E-64; 0.01 mM para PMSF; 0.1 mM para TPCK y 0.1 mM para 1, 10-fenantrolina.

Así, en los ensayos de adhesión de la cepa WB a IEC-6 (**Figura 17, barras con líneas verticales**) se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores del 40% con los inhibidores TPCK, PMSF y 1,10-fenantrolina y con el inhibidor E-64 se obtuvo 30% de inhibición de la citoadherencia. Con respecto a la clona C5 (**Figura 17, barras blancas**), los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron con PMSF (35%) y TPCK (45%), siendo menores para E-64 (32%) y 1,10-fenantrolina (34%). El empleo de los diferentes inhibidores afectó la adhesión de la clona C7 (deficiente en adhesión) levemente (4-6%) (**Figura 17, barras punteadas**).

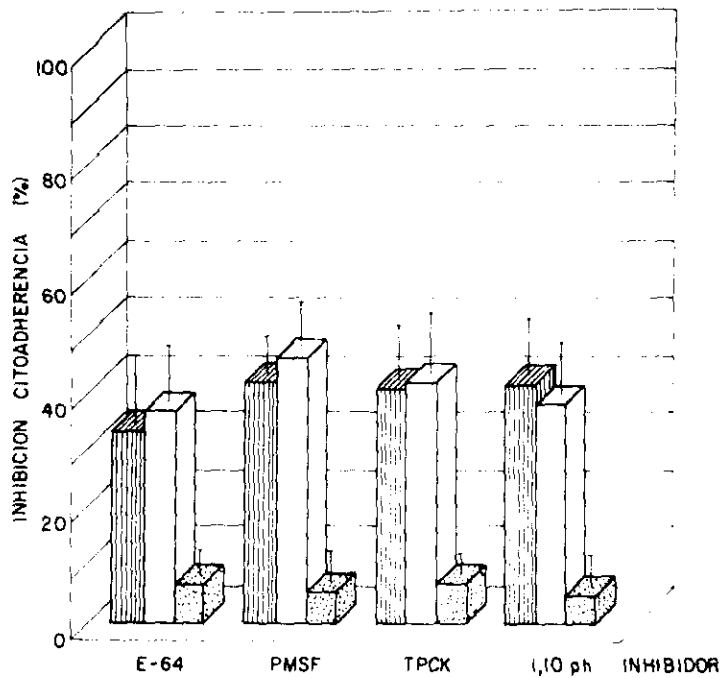


Figura 17. Valores de inhibición de la citoadherencia de los trofozoítos de la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* a la línea celular IEC-6 empleando inhibidores de proteasas. Trofozoítos de la cepa WB (barras con líneas verticales) y de las dos clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) (1.3×10^6) fueron pretratados con los siguientes inhibidores: E-64 (0.001 mM), PMSF (0.01 mM), TPCK (0.1mM) y 1,10-fenantrolina (0.1 mM) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se efectuó el ensayo de citoadherencia como se describió en Materiales y Métodos.

Por otro lado, en los ensayos de citoadherencia de la cepa WB a la línea celular MDCK (Figura 18, barras verticales), se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores del 40% (43-46%) en presencia de los 4 inhibidores de proteasas. Con la clona C5 (Figura 18, barras blancas) se observó con el empleo de E-64, TPCK y 1,10 fenantrolina un 40% de inhibición de la citoadherencia y con PMSF un 28%. En relación con la clona C7 (Figura 18, barras punteadas) se obtuvieron porcentajes de inhibición de la adhesión de 6 a 12, siendo E-64 el inhibidor con el que se obtuvo más inhibición.

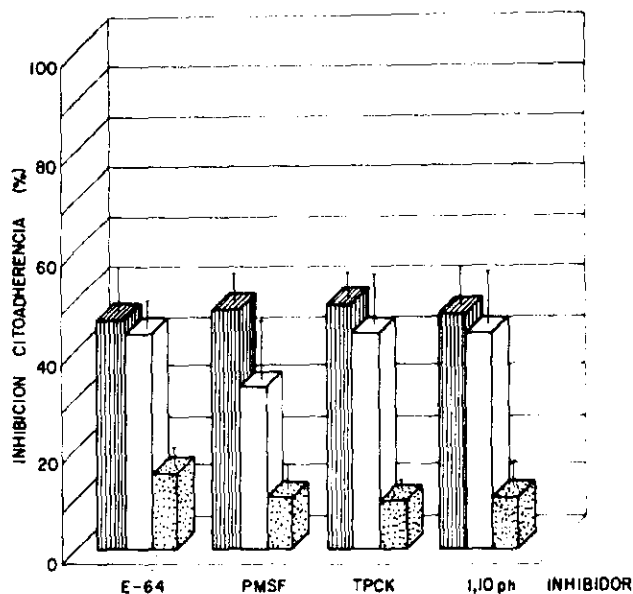


Figura 18. Valores de la inhibición de la citoadherencia de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* a la línea celular MDCK empleando inhibidores de proteasas. Trofozoítos de la cepa WB (barras con líneas verticales) y de las dos clonas C5 (barras blancas) y C7 (barras punteadas) (1.3×10^6) fueron pretratados con los siguientes inhibidores: E-64 (0.001 mM), PMSF (0.01 mM), TPCK (0.1mM) y 1,10-fenantrolina (0.1 mM) durante 30 min a 37°C. Posteriormente los trofozoítos se lavaron y se pusieron a interactuar con la línea celular como se describió en Materiales y Métodos.

- **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* DESPUES DE LA INTERACCION CON CELULAS MDCK E IEC-6.**

Para el análisis de la actividad proteolítica en sobrenadantes de la interacción de los trofozoítos de la cepa WB y la clona C7 con las líneas celulares MDCK e IEC-6, el sobrenadante se concentró con un sistema de ultrafiltración y posteriormente se analizó en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizado con gelatina. Los resultados obtenidos en este análisis se muestran en la **Figura 19**. En el caso de los trofozoítos de WB en interacción con la línea IEC-6, se detectaron nueve bandas de actividad con pesos moleculares de 19, 22, 64, 90, 102, 125, 127, 139 y 160 kDa (**carril 4**). Cuando se analizó el sobrenadante de la cepa WB cultivada sola, se observaron siete bandas con actividad proteolítica de aproximadamente 19, 22, 64, 90, 102, 125 y 127 kDa (**carril 3**). En el caso del sobrenadante de interacción de la clona C7 con la línea celular IEC-6, se detectaron dos bandas con baja actividad proteolítica y pesos moleculares de 90 y 137 kDa, mismas que se observaron en el sobrenadante de trofozoítos de la clona C7 cultivados solos (**carril 7 y 8, respectivamente**).

En lo que respecta al sobrenadante de interacción de la cepa WB con la línea celular MDCK (**carril 5**) se detectó la presencia de seis bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares de 22, 64, 90, 125, 127 y 172 kDa. Es importante mencionar que cuando el medio DMEM solo, se concentró, no se detectaron bandas de actividad proteolítica (**carril 1**), tampoco se detectó actividad en el medio DMEM donde se incubó la línea celular IEC-6 (**carril 2**), en cambio, en el caso del medio de cultivo en donde se incubó la línea celular MDCK (**carril 6**) se detectó una banda con actividad proteolítica de 172 kDa.



Figura 19. Análisis electroforético de los sobrenadantes de interacción de los trofozoítos de la cepa WB y la clona C7 de *G. lamblia* con las líneas celulares IEC-6 y MDCK. Trofozoítos de la cepa y de la clona (1.3×10^6) se pusieron en contacto con las líneas celulares y se incubaron durante 2 h a 37°C en 5% CO_2 . Posteriormente se colectó el sobrenadante y se filtró con una membrana Millipore de $0.22 \mu\text{m}$ de poro, para después concentrarse 20X en un sistema de ultrafiltración. Los sobrenadantes se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina al 0.2%. Las muestras analizadas fueron: medio D-MEM (carril 1), sobrenadante de la línea celular IEC-6 (carril 2), sobrenadante de cultivo de trofozoítos de la cepa WB (carril 3), sobrenadante de interacción IEC-6/WB (carril 4), sobrenadante de la línea celular MDCK (carril 5), sobrenadante de interacción MDCK/WB (carril 6), sobrenadante de cultivo de trofozoítos de la clona C7 (carril 7), sobrenadante de interacción IEC-6/C7 (carril 8). Las flechas indican las actividades proteolíticas de los sobrenadantes de la clona C7.

V. DISCUSION

En estudios previos realizados en otros protozoarios, se ha puesto de manifiesto que las proteasas representan un factor importante en la patogenia de la enfermedad; ya sea mediante intervenci3n en la destrucci3n celular como es el caso de *Entamoeba histolytica*, facilitando la invasi3n como con *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*, o bien, por estar relacionadas con los mecanismos de adhesi3n a las c3lulas blanco como en el caso de *T. vaginalis*.

A este respecto, aunque el proceso de prote3lisis podr3a estar involucrado en la nutrici3n, desarrollo y patogenicidad de *Giardia*, es relativamente poco lo que se conoce acerca de las proteasas producidas por este flagelado. Por lo que, considerando que en la patogenia de la giardiosis, la adhesi3n del microorganismo al epitelio intestinal es el primer paso en el establecimiento de la enfermedad, result3 de gran inter3s en este estudio caracterizar las proteasas de *G. lamblia* y evaluar, as3 como analizar, si exist3a alguna relaci3n entre la actividad proteol3tica de este par3sito y el proceso de adhesi3n a las c3lulas epiteliales.

Para poder desarrollar este trabajo, se escogi3 a la cepa WB y a dos clonas derivadas de ella, C5 y C7, cuyas caracter3sticas de adhesi3n a la l3nea celular MDCK fueron previamente caracterizadas (Hern3ndez, 1992). La clona C5 tiene una eficiencia de adhesi3n del 80%, caracteriz3ndose como una clona con adhesi3n eficiente, ya que se adhiere a MDCK de manera similar que la cepa WB, y a la clona C7 se le consider3 como deficiente en adhesi3n ya que presenta s3lo el 30% de capacidad de adhesi3n a esta l3nea celular (Hern3ndez, 1992). Asimismo, mediante el empleo del anticuerpo monoclonal IG3 dirigido contra ep3topos de prote3nas de superficie de *G. lamblia* se

demostró que éste inhibe la adhesión de trofozoítos de la cepa WB a células MDCK. También, mediante inmunofluorescencia indirecta se observó que IG3 reaccionaba con más del 99% de los trofozoítos de la cepa WB y menos del 1% con la clona C7. Por otro lado, en ensayos de inmunoelectrotransferencia empleando extracto celular de la cepa WB, el anticuerpo IG3 reconoció predominantemente una proteína de 200 kDa, la cual no fue reconocida en la clona C7. El hecho de que la clona C7 sea deficiente en adhesión y no tenga la molécula de 200 kDa, sugiere la participación de ésta en la adhesión de los trofozoítos de *G. lamblia* a las células epiteliales (Hernández, 1992).

En este trabajo, el análisis electroforético realizado con los extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7 sirvió, por un lado, para evaluar si existía degradación o no en las proteínas de los extractos solubles y por otro, para confirmar la presencia de la molécula de 200 kDa en la cepa WB y las clonas C5 y su ausencia en la clona C7, como una característica de ellas.

Por otro lado, es importante mencionar que la comparación de las actividades proteolíticas presentes entre clonas eficientes y deficientes en adhesión permitiría correlacionar de manera indirecta las diferencias que éstas presentaran en sus proteasas (cantidad y tipo) con la interacción parásito-hospedero. La adhesión de la clona C7 se utilizó como un control, ya que esta clona es deficiente en adhesión y el analizar su actividad proteolítica podría proporcionar evidencias de la presencia o ausencia de determinadas proteasas en comparación con la cepa WB y la clona C5 que pudieran ser importantes en el proceso de adhesión.

En la evaluación de la actividad proteolítica de *G. lamblia*, se realizó una determinación del tipo de proteasas presentes en los extractos de la cepa WB y las clonas C5 y C7, empleando un método colorimétrico con azocaseína al 2%

como sustrato, así como su caracterización mediante un análisis electroforético empleando geles de poliacrilamida-SDS copolimerizados con gelatina.

Con respecto al método colorimétrico, a partir de la estandarización de las condiciones, fue posible determinar la cantidad de proteína adecuada para este ensayo que permitiera detectar la actividad real de esta y evitar trabajar en el punto de saturación de la enzima. Así, en el ensayo colorimétrico, se trabajó con 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, concentración que se encontraba en la parte lineal de la gráfica. Por otro lado, es importante hacer resaltar que el valor de pH también es importante ya que dependiendo del tipo de enzima que se trate será el valor óptimo de pH para trabajar y poder tenerla a su máxima actividad. Durante la estandarización de las condiciones del método se obtuvo actividad proteolítica en el intervalo de pH de 3 a 7.6, sin embargo, a pH 5.5 se observaron los valores máximos de actividad enzimática tanto para la cepa como para las clonas, por lo que se seleccionó este pH para realizar los siguientes ensayos.

Así, bajo las condiciones estandarizadas se detectó que tanto la cepa WB como las clonas C5 y C7 tienen contenido diferente de proteasas, sin embargo, tanto la cepa como las clonas tienen principalmente proteasas de tipo cisteína, serina y metalo.

Aparentemente se detectó actividad de proteasas de tipo aspártico en la clona C7, sin embargo en la cepa WB y la clona C5 no se observó este tipo de actividad proteolítica. Lo anterior, se requiere investigar en detalle, ya que de acuerdo a lo reportado por Williams y Coombs (1995) empleando Pepstatina 1 mM, existen proteasas de tipo aspártico en extractos solubles de trofozoítos de la cepa P1 de *G. lamblia*. Es posible que en este trabajo no se haya detectado este tipo de proteasas ni en la cepa WB ni en la clona C5, debido al uso de una concentración más baja del inhibidor Pepstatina (1 μM), lo que sugeriría que la concentración requerida para inhibir la actividad proteolítica presente en la cepa

WB y la clona C5 es mayor. Cabe mencionar que las concentraciones utilizadas por nosotros para esta determinación se seleccionaron en base a lo recomendado en la literatura (Beynon y Bond, 1994), que se consideran como las máximas permitidas, ya que, a concentraciones mayores se considera la posibilidad de inhibición inespecífica. Por otro lado, en este análisis debe de tomarse en cuenta que únicamente se empleó como sustrato azocaseína y que quizás la utilización de sustratos peptídicos sintéticos (fluorogénicos y cromogénicos), y el empleo de diferentes sustratos en la determinación colorimétrica, así como matriz en el gel (α y β caseína, colágena, etc) ampliaría el análisis y caracterización de las diferentes proteasas presentes en *G. lamblia*, ya que permitiría detectar un mayor número de proteasas en base a la preferencia por el sustrato.

Asimismo, las diferencias en el tipo y cantidad de proteasas detectadas en la cepa WB y las dos clonas pueden ser debidas directamente a variaciones específicas entre clonas y también a que los inhibidores no son completamente específicos, es decir, así como actúan sobre un tipo de proteasas también pueden hacerlo sobre otro tipo, como el caso de TPCK, el cual tiene efecto sobre proteasas de tipo serina pero también de tipo cisteína, por lo que las diferencias observadas pueden deberse a diferencias en la especificidad de las proteasas. Es importante considerar, además, que varios inhibidores para diferentes tipos de proteasas pueden actuar sobre una misma proteasa, siempre y cuando ésta tenga en su sitio activo el aminoácido blanco.

Por otro lado, cuando se realizó otro ensayo colorimétrico empleando los inhibidores E-64, TPCK y 1,10-fenantrolina a concentraciones referidas por Williams y Coombs (1995) (1 mM, 0.33 mM y 1mM, respectivamente), los porcentajes de inhibición obtenidos con los tres inhibidores, en el caso de la cepa WB fueron mayores (56, 47 y 47, respectivamente) que los obtenidos en el primer ensayo colorimétrico empleando 10 μ M de E-64, 1 mM de TPCK y 10 mM

de 1,10-fenantrolina (**Tabla 1**). En relación con la clona C5, los porcentajes de inhibición de la actividad proteolítica con E-64 (49%) y TPCK (46%), fueron similares a los obtenidos con las concentraciones empleadas inicialmente (43 y 42%, respectivamente) (**Tabla 1**). Sin embargo, con 1 mM del inhibidor 1,10-fenantrolina se obtuvo una menor inhibición (26%). Con respecto a la clona C7, se observó que con los inhibidores E-64 y TPCK, se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores (37% y 31%, respectivamente) que los obtenidos en el primer ensayo colorimétrico (**Tabla 1**) observándose también menor inhibición con 1,10-fenantrolina (19%). Es posible que el menor efecto de 1,10-fenantrolina, cuando se empleó a una concentración de 1 mM comparado con el efecto observado cuando el inhibidor se empleó a una concentración 10 veces mayor (**Tabla 1**), sea un reflejo de una disminución de la inhibición inespecífica sobre la actividad proteolítica. Sin embargo, en este ensayo, se confirmó que tanto la cepa como las dos clonas tienen actividad proteolítica tipo cisteína, serina y metalo. Además, se puso de manifiesto en este ensayo, que la clona C7 tiene menor actividad proteolítica o que ésta no se inhibe de igual forma que la cepa WB y la clona C5.

En términos generales, los resultados de los ensayos colorimétricos muestran que tanto la cepa WB como las clonas C5 y C7 difieren en su contenido de proteasas, ya que no respondieron de igual forma con los mismos inhibidores, así como también muestran diferencias en la cantidad y/o especificidad de estas enzimas, ya que los porcentajes de inhibición obtenidos no son iguales aún y cuando el mismo inhibidor tenga efecto sobre la cepa WB y las clonas C5 y C7.

Por otro lado, en el análisis electroforético se observó que efectivamente los inhibidores seleccionados para cisteína, serina y metalo proteasas inhibieron bandas definidas de actividad proteolítica. Así, en el caso de la cepa WB, la banda de 160 kDa desapareció completamente al emplear el inhibidor E-64, por

lo que se consideró del tipo cisteína. Las bandas de 95, 100 y 110 kDa fueron inhibidas principalmente con PMSF por lo que posiblemente se trate de proteasas de tipo serina. Por otro lado, las bandas de 19, 60 y 74 kDa fueron inhibidas con Iodoacetamida y 1,10-fenantrolina, por lo que se requiere evaluar si son activadas con cisteína o con $MgCl_2$ y de esta forma determinar el tipo de proteasa al que pertenecen.

En el caso de la clona C5, las bandas de 95, 110 y 180 kDa, fueron inhibidas completamente al emplear E-64, aunque dos de ellas (110 y 180 kDa) fueron inhibidas también con TPCK y PMSF; sin embargo debido a que TPCK tiene efecto sobre proteasas de tipo serina y cisteína y que E-64 inhibe de manera específica a proteasas de tipo cisteína, es probable que estas bandas correspondan a proteasas de tipo cisteína, aunque es necesario que se utilice DTT o cisteína con objeto de determinar si son proteasas de tipo cisteína. También las bandas de menor peso molecular corresponden a proteasas de tipo cisteína debido a que mostraron porcentajes de inhibición altos con inhibidores para este tipo de proteasas. Con respecto a las bandas de actividad proteolítica detectadas en los extractos solubles de la clona C7, se observó que las 4 bandas son inhibidas con E-64 por lo que se podrían considerar de tipo cisteína, sin embargo, dado que las bandas de 80, 91 y 100 kDa son también inhibidas con otros inhibidores (PMSF, 1,10-fenantrolina), es conveniente probar si su actividad proteolítica se activa en presencia de DTT o cisteína y $MgCl_2$ y así poder determinar con mayor certeza el tipo de proteasa al que pertenecen.

El hecho de que tanto en el método colorimétrico como en el análisis electroforético se observó que diferentes inhibidores podrían inhibir una misma banda de actividad proteolítica, podría explicarse considerando que la banda representara la actividad de más de un tipo de proteasa, por lo que sería importante realizar el análisis electroforético bajo condiciones diferentes, como serían la cantidad de acrilamida o geles bidimensionales con la finalidad de

mejorar la resolución de este análisis. Otra alternativa podría ser el que la banda representara una proteasa capaz de ser inhibida por diferentes inhibidores, para lo cual se requeriría que la proteasa tuviera en su secuencia, el aminoácido blanco para estos inhibidores.

Cabe mencionar que el empleo del análisis densitométrico fue una herramienta útil para dar una idea cercana de la magnitud de la inhibición con cada uno de los diferentes inhibidores, sin embargo una desventaja en el empleo de este analizador es que en ocasiones el valor numérico obtenido no es el reflejo fiel de lo observado en el gel. Lo anterior puede atribuirse a que en este análisis es necesario delimitar la superficie de cada una de las bandas, lo cual en ocasiones resulta difícil de hacerse, además, en el caso de bandas muy cercanas, el analizador de imágenes las considera como una sola banda.

Sin embargo, como resultado del análisis densitométrico, fue evidente que con E-64 se logró inhibir en mayor porcentaje la actividad de proteasas de la cepa WB y de las clonas C5 y C7, confirmando que la actividad de cisteína-proteasas es mayoritaria en *G. lamblia*.

Por otro lado, se llevaron a cabo los ensayos para determinar viabilidad y actividad metabólica, por el método de resiembra y el método de MTT/PMS, respectivamente, de los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 utilizando diferentes concentraciones de los inhibidores. Lo anterior se realizó con objeto de determinar las concentraciones óptimas que se podrían emplear en los ensayos de citoadherencia sin que los trofozoítos se vieran afectados. En estos ensayos se puso de manifiesto que trofozoítos de la cepa y las dos clonas responden de manera diferente a los mismos inhibidores. Un aspecto interesante que se observó, consistió en la mayor susceptibilidad de la cepa WB y la clona C5 a los inhibidores E-64 y TPCK y la menor susceptibilidad de la clona C7 a los mismos inhibidores. A este respecto, cabe mencionar que en la

determinación colorimétrica se evidenció que la actividad proteolítica presente en la clona C7 era menos susceptible precisamente a los inhibidores E-64 y TPCK. Posiblemente, esto último explique los resultados obtenidos en la disminución de la viabilidad y actividad metabólica de los trofozoítos de la clona C7. Es importante hacer notar que los resultados obtenidos de viabilidad con los diferentes inhibidores en su mayoría correlacionaron con los de actividad metabólica.

Para llevar a cabo los ensayos de citoadherencia se seleccionaron concentraciones de los inhibidores que no afectaran más del 20% de la viabilidad de los trofozoítos, determinado principalmente por el método de resiembra, además de que no dañaran a las líneas celulares.

Es importante mencionar que la línea celular MDCK ha sido ampliamente usada en ensayos de adhesión de *G. lamblia* (Knaippe, 1990; Enciso, 1990; Hernández, 1992; Alvarado, 1994), sin embargo, esta línea celular proviene de células epiteliales de riñón de perro y no representa el microambiente de *Giardia*, por lo que en este estudio era de gran importancia, realizar los ensayos de adhesión de los trofozoítos con otra línea celular con características más cercanas al hábitat del parásito. Para esto, se escogió a la línea celular IEC-6, que proviene de células epiteliales de intestino delgado de rata y de forma paralela se determinó si los trofozoítos de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 se adhieren de igual manera a IEC-6 que a la línea celular MDCK.

Así, en los ensayos de adhesión se determinó que los trofozoítos de la cepa WB y de las dos clonas se adhieren de manera similar a las líneas celulares IEC-6 y MDCK. En estos ensayos se obtuvo para la cepa WB y la clona C5 una eficiencia de adhesión de alrededor del 80% a ambas líneas celulares. Con respecto a la clona C7, el porcentaje de adhesión fue de 30%. Asimismo, se puso de manifiesto que los inhibidores E-64, PMSF, TPCK y 1,10-fenantrolina,

inhiben de manera importante la adhesión de los trofozoítos de la cepa WB y la clona C5 tanto a la línea celular MDCK (28-46%) como a IEC-6 (30-45%). Con el empleo de los mismos inhibidores se afectó la adhesión de la clona C7 a ambas líneas celulares en un 4-12%. En estos ensayos no se observaron grandes diferencias entre las 2 líneas celulares. Dado que los porcentajes de inhibición con los 4 inhibidores empleados, obtenidos con ambas líneas celulares son similares, podría considerarse que se trata de 3 tipos de proteasas, aunque basándonos en el hecho de que TPCK y PMSF afectan proteasas tanto de tipo cisteína como serina y E-64 a proteasas de tipo cisteína, podría pensarse que en realidad se trata de proteasas principalmente de tipo cisteína y metalo-proteasas. Por otro lado, es posible que se trate de una o más proteasas que contengan en su secuencia a los aminoácidos que son reconocidos por más de un inhibidor. Sin embargo, independientemente del tipo y número de proteasas, los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la citoadherencia sugieren la participación de las proteasas de *G. lamblia* en el proceso de adhesión del parásito a las células epiteliales.

Con respecto a los ensayos de citoadherencia, es importante mencionar que los trofozoítos se incubaron con los inhibidores de proteasas y posteriormente se lavaron para ser incubados con las líneas celulares. Los trofozoítos se lavaron con la finalidad de poder observar el efecto de los diferentes inhibidores sobre las proteasas del parásito y así analizar su participación en el proceso de adhesión; ya que de no lavarse era posible que los inhibidores también afectaran enzimas de la célula epitelial. Un inconveniente de haber realizado los lavados, sería el hecho de que el inhibidor formara enlaces no covalentes (Fuerzas de Vander Waals, iónico) con la enzima, eliminándose con los lavados, sin embargo en nuestro sistema se emplearon inhibidores que forman uniones covalentes, con lo que aseguramos que el efecto del inhibidor permanecía aún después de lavar los trofozoítos.

Además, de acuerdo a lo anterior, los resultados obtenidos en estos ensayos muestran que hubo inhibición de la adhesión bajo las condiciones empleadas.

Por otro lado, un aspecto de controversia en *Giardia*, es el relacionado con la posible secreción de proteasas. Con anterioridad, Parenti y cols. (1989) reportaron escasa actividad proteolítica en filtrados de cultivos de trofozoítos. Sin embargo, Alvarado (1994) demostró en sobrenadantes de trofozoítos de diferentes aislados de *G. lamblia*, la presencia de proteasas y que durante su interacción con la línea celular MDCK se estimulaba la secreción de 6 proteasas con pesos moleculares de 21, 23, 25, 78 y 82 kDa y dos bandas con menor actividad proteolítica con pesos moleculares de 85 y 92 kDa.

En este estudio se llevó a cabo el análisis de la actividad proteolítica en los sobrenadantes de los trofozoítos de *G. lamblia*, en interacción con las líneas celulares MDCK e IEC-6, con objeto de determinar si existen diferencias en la secreción de proteasas cuando los trofozoítos interactúan con dos líneas epiteliales de diferente origen. Lo anterior, resulta de gran interés ya que se tiene el antecedente que *T. vaginalis* puede adherirse tanto a células HeLa como a células VEC (representativa del hábitat del parásito), pero solamente se transforma de la forma elíptica a la ameboide en presencia de las células VEC (Alderete y cols., 1995).

En este análisis, sólo se utilizó a la cepa WB y a la clona C7; la clona C5 no se incluyó, debido a que en los ensayos de citoadherencia e inhibición de la adhesión, esta clona presentó características similares a las presentadas por la cepa WB.

Así, el análisis de los sobrenadantes de trofozoítos de la cepa WB y la clona C7 de *G. lamblia* cultivados solos, reveló la presencia de actividad proteolítica, observándose, se observaron diferencias entre ellas, ya que la cepa

WB secretó siete proteasas de aproximadamente 19, 22, 64, 90, 102, 125 y 127 kDa, y la clona C7 sólo secretó dos bandas con actividad proteolítica de aproximadamente 90 y 137 kDa. Las diferencias en los sobrenadantes entre la cepa y la clona fueron más evidentes cuando los trofozoítos estuvieron en interacción con las líneas celulares. Así, en los sobrenadantes de la cepa WB en presencia de la línea celular IEC-6, se observaron nueve bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares de 19, 22, 64, 90, 102, 125, 127, 139 y 160 kDa y seis bandas con actividad proteolítica con pesos moleculares de 22, 64, 90, 125, 127 y 172 kDa en interacción con la línea celular MDCK. Con respecto a la clona C7, sólo se analizó el sobrenadante de la interacción de la clona con la línea celular IEC-6 y no se observó cambio en el número de bandas con actividad proteolítica cuando los trofozoítos se cultivaron en interacción con la línea celular IEC-6 en relación con las secretadas por los trofozoítos cultivados solos.

Es importante mencionar que en el caso de los sobrenadantes de la línea celular MDCK cultivada sola, se detectó una banda con actividad proteolítica de 172 kDa, a diferencia de la línea IEC-6 en cuyos sobrenadantes no se detectó actividad proteolítica. Es posible que la molécula de 172 kDa detectada en los sobrenadantes de la cepa WB en interacción con la línea celular MDCK corresponda a la proteasa secretada por la misma MDCK.

Considerando los resultados obtenidos en este análisis es evidente que la interacción de la cepa WB con la línea celular IEC-6 estimula la secreción de al menos dos proteasas la de 139 y 160 kD, las cuales no se detectaron cuando la cepa WB se cultivó en presencia de la línea celular MDCK, aunado a la desaparición de la molécula de 19 kDa. Resulta de gran interés determinar la participación de las proteasas de 139 y 160 kDa en la adhesión del parásito a las células epiteliales IEC-6 y en especial la de 160 kDa ya que en los

sobrenadantes de la clona C7 no se detectó esta banda de actividad proteolítica.

Las diferencias encontradas en la actividad proteolítica en la cepa WB y la clona C7 tanto en los ensayos colorimétricos como en el análisis electroforético, además de la secreción de proteasas, sugieren que posiblemente la menor actividad proteolítica observada en la clona C7 pueda afectar su capacidad de adhesión a las células epiteliales.

Además, a pesar de que se observó que la secreción de proteasas de los trofozoítos de la cepa WB se estimula durante su interacción con la línea IEC-6, se desconoce si las proteasas participan de manera directa o indirecta en la adhesión del parásito a las células epiteliales, es decir, si para la adhesión se requiere la secreción de proteasas o ésta es resultado de la adhesión.

Para continuar con la caracterización de las proteasas secretadas por la cepa WB en interacción con la línea celular IEC-6 sería conveniente continuar realizando experimentos que incluyan inhibidores de proteasas que permitan determinar el tipo de proteasas secretadas. Además, el empleo de anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos de superficie de *G. lamblia* que inhiban la adhesión del parásito a células epiteliales permitiría determinar si en el caso de la interacción de la cepa WB con la línea celular IEC-6 se requiere el contacto directo para la secreción de proteasas o la estimulación se realiza mediante factores solubles. A este respecto, Alvarado (1994) demostró que fracciones subcelulares de la línea celular MDCK, específicamente citosol, así como medio en donde se cultivó la línea epitelial, son capaces de estimular la secreción de proteasas por el parásito, sugiriendo que no se requiere el contacto celular para la secreción. Sin embargo, el empleo de anticuerpos proporcionará mayor información de este proceso.

Por otro lado, es importante realizar la purificación de las proteasas del parásito mediante técnicas de cromatografía ya sea por afinidad o por columnas de intercambio iónico, para posteriormente llevar a cabo la producción de anticuerpos monoclonales contra alguna de las proteasas purificadas. Una vez obtenidos los anticuerpos monoclonales, se podrían realizar ensayos de inhibición de la adhesión a la línea celular IEC-6 y evaluar la participación directa de determinadas proteasas en el proceso de adhesión de *G. lamblia*. Asimismo, con los anticuerpos producidos se podrían realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización de estas proteasas.

Además, a partir de la identificación de la(s) proteasa(s) que participan en la adhesión, se podría determinar su secuencia de aminoácidos y en base a ésta, se procedería a la síntesis de oligonucleótidos y mediante PCR realizar su amplificación para realizar estudios moleculares que permitan estudiar su regulación y su comparación con secuencias conocidas de otras moléculas que permitan inferir su función.

Dado que las proteasas de tipo cisteína fueron las que principalmente se detectaron en los extractos solubles de la cepa WB y las clonas C5 y C7 y aunque falta determinar si son mayoritarias en los sobrenadantes, resulta de interés determinar si las proteasas secretadas que fueron determinadas en este estudio, tienen homología con las proteínas variantes de superficie del parásito, ya que se sabe que las VSP's tienen un alto contenido de cisteína, además de que son secretadas al medio (Papanastasiou y cols., 1996), sin embargo, no se tiene conocimiento acerca de si tienen actividad proteolítica o no. Para lo anterior, sería necesario purificar las proteasas secretadas, determinar su secuencia de aminoácidos y comparar ésta con moléculas de superficie conocidas.

Todos los estudios antes mencionados contribuirán de manera importante a determinar con mayor certeza la participación de las proteasas de *G. lamblia* en el proceso de adhesión a células epiteliales, así como su caracterización.

VI. CONCLUSIONES

- Mediante el ensayo colorimétrico con azocaseína como sustrato y empleando inhibidores específicos de proteasas, se determinó que la actividad proteolítica presente en la cepa WB y las clonas C5 y C7 de *G. lamblia* fue principalmente de tipo cisteína, serina y metalo.
- El análisis electroforético de los extractos solubles de la cepa WB y la clona C5 de *G. lamblia* reveló la presencia de siete bandas con pesos moleculares de 19 a 160 kDa y de 19 a 180 kDa, respectivamente. En relación con la clona C7 se observaron cuatro proteasas con pesos moleculares de 80 a 126 kDa.
- El análisis densitométrico demostró la presencia de proteasas de tipo cisteína y serina y posiblemente de tipo metalo en extractos solubles de la cepa WB. Sin embargo en las clonas C5 y C7 se determinó la presencia de proteasas principalmente de tipo cisteína.
- La viabilidad y actividad metabólica de la clona C7 fue menos afectada por inhibidores para proteasas de tipo cisteína y serina que la cepa WB y la clona C5. La cepa WB mostró una susceptibilidad mayor que las clonas C5 y C7 a inhibidores para proteasas de tipo serina.
- La adhesión de los trofozoítos de la cepa WB y la clona C5 a las líneas celulares IEC-6 y MDCK disminuyó con los inhibidores E-64, 1,10-fenantrolina, PMSF y TPCK entre 30-46%. La adhesión de la clona C7 se inhibió entre 4-12% en presencia de los mismos inhibidores.

- Los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión de la cepa WB y de las clonas C5 y C7 a las líneas celulares IEC-6 y MDCK empleando los inhibidores de proteasas: E-64, PMSF, TPCK y 1,10-fenantrolina, sugieren la participación de las proteasas de *G. lamblia* en el proceso de adhesión a las células epiteliales.
- La interacción de trofozoítos de la cepa WB con células IEC-6, estimuló la secreción de nueve bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares entre 19 y 160 kDa. La interacción de trofozoítos de la cepa WB con células MDCK, estimuló la secreción de siete bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares entre 22 y 172 kDa. Con respecto al sobrenadante de interacción de la clona C7 reveló la actividad de 2 proteasas con pesos moleculares de 90 y 137 kDa, así como también en el caso del sobrenadante de cultivo de trofozoítos de la clona C7.
- La interacción de trofozoítos de la cepa WB con la línea celular IEC-6, estimula la secreción de proteasas. Sin embargo, la interacción de la clona C7 con la línea IEC-6 no estimula la secreción de proteasas.

APENDICE A

MEDIO TYI-S-33 SUPLEMENTADO CON BILIS

Biosate-peptona BBL	30.0 g
Glucosa	10.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Cisteína-monoclorhidrato	2.0 g
Acido ascórbico	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico	0.6 g
Fosfato de potasio dibásico	1.0 g
Citrato férrico de amonio	0.23 g

Disolver en 800 mL de agua bidestilada con agitación constante.

Ajustar el pH a 6.8-7.0 y aforar a 900 mL.

Completar con 100 mL de suero bovino descomplementado y 1 mL de stock de penicilina (250 UI/mL)-estreptomicina (250 µg/mL).

Almacenar a -20°C hasta su uso.

APENDICE B

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS

Para la elaboración de geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio en condiciones reductoras es necesario preparar las siguientes soluciones:

***Amortiguador para el gel concentrador (BGC 8X)**

50 mL de Trisma base 2M pH 6.8

4 mL de SDS al 20%

Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril.

***Amortiguador para el gel espaciador (BGE 5X)**

187.5 mL de Trisma base 2M pH 8.8

5.0 mL de SDS al 20%

Aforar a 200 mL con agua bidestilada estéril.

***Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0.8%**

60.0 g de acrilamida

1.6 g de N'N'-metilen-bis-acrilamida

60.0 mL de glicerol

Aforar a 200 mL con agua bidestilada y posteriormente filtrar varias veces con membrana 0.22 μ m.

***Amortiguador de muestra 5X**

1.56 mL de Trisma base 2M pH 6.8
5.0 mL de SDS al 20%
1.94 mL de glicerol
500 μ L de pironina al 2% en glicerol al 60%

Aforar a 10.0 mL con agua bidestilada.

PREPARACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 10%

***ESPACIADOR AL 10%**

3.76 mL de BGE 5X
8.88 mL de agua bidestilada estéril
6.32 mL de acrilamida/bisacrilamida 30:0.8%
12 μ L de TEMED
44 μ L de persulfato de amonio al 10%

***CONCENTRADOR AL 5%**

2.5 mL de BGC 8X
14.16 mL de agua bidestilada estéril
3.32 mL de acrilamida/bisacrilamida 30:0.8%
12 μ L de TEMED
110 μ L de persulfato de amonio al 10%

En el caso de los geles copolimerizados con gelatina, se adiciona la gelatina al 0.2% (p/v) en el volumen correspondiente a agua, sólo en el caso del gel espaciador.

APENDICE C

*SOLUCION PARA TEÑIR LOS GELES DE POLIACRILAMIDA COPOLIMERIZADOS CON GELATINA

500 mL de metanol al 50%

100 mL de ácido acético al 10%

1 g de azul de Coomassie al 0.1%

Aforar a 1L con agua bidestilada estéril.

*SOLUCION PARA DESTENIR

100 mL de ácido acético al 10%

Aforar a 1L con agua bidestilada estéril.

*MARCADORES DE PESO MOLECULAR (Pharmacia)

-Alto peso molecular-

tiroglobulina	669 kDa
ferritina	440 kDa
catalasa	232 kDa
lactato-ligasa	140 kDa
albúmina	67 kDa

-Bajo peso molecular-

fosforilasa b	94 kDa
ASB	67 kDa
ovoalbúmina	43 kDa
anhidrasa	
carbónica	30 kDa
inh.tripsina	20 kDa
α -lactoalbúmina	14.4 kDa

APENDICE D

CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS TOTALES DE LOS LISADOS CELULARES DE TROFOZOITOS DE LA CEPA WB Y DE LAS CLONAS C5 Y C7

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry y cols., (1951) modificado. Para la realización de la curva patrón, se emplearon diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (ASB) (Fracción V, Sigma ST. Louis Missouri, E.U.A). La determinación se realizó de la siguiente manera:

* Volúmenes tomados a partir del stock de ASB (1 mg/mL)

** Solución de Tritón X-100 al 10%

*** Solución preparada (sol.E) a partir de la mezcla de 1 volumen de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% y 1 volumen de tartrato de sodio y potasio al 2%, más 50 volúmenes de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1N.

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
*ASB (μL)	-	10	20	40	60	80	100	-
H ₂ O (μL)	500	490	480	460	440	420	400	490
Muestra (μL)	-	-	-	-	-	-	-	10
**Tritón (μL)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	-
***Sol. E (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Se mezcló el contenido de cada tubo y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck, Darmstadt, Alemania) diluido 1:2 y 500 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 5%. Los tubos se agitaron en vórtex y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se leyeron las muestras a 750 nm contra el blanco de reacción (espectrofotómetro DU-65, Beckman). La concentración de proteínas de los extractos totales se calculó por interpolación con la curva patrón de albúmina

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adam, R. D. The biology of *Giardia spp.* Microbiol. Rev. 1991; 55: 706.
- Adam, R. D., Aggarwal, A., Lal, A. A., De la Cruz, V. F., McCuthan, T., Nash, T. E. Antigenic variation of cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. J. Exp. Med. 1988; 167: 109.
- Addis, D. G., Davis, J. P. Epidemiology of giardiasis in Wisconsin: increasing incidence of reported cases and unexplained seasonal trends. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1992; 47: 13.
- Aggarwal, A., Nash, T. E. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 36: 325
- Aggarwal, A., Nash, T. E. Antigenic variation of *Giardia lamblia in vivo*. Infect. Immun. 1988; 56: 1420.
- Aggarwal, A., Merrit, J. W., Nash, T. E. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1989; 32: 39.
- Alderete, J. F. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 1991; 174: 311.
- Alderete, J. F., Garza, G. E. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of cell host surfaces. Infect. Immun. 1985; 50: 701.
- Alderete, J. F., Demés, P., Gombosóva, A., Valent, M., Fabusóva, M., Jánoska, A., Stefanóvic, J., Arroyo, R. Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 1988; 56(10): 2558.
- Alderete, J. F., Neale, K. A. Relatedness of structures of a major immunogen in *Trichomonas vaginalis* isolates. Infect. Immun. 1989; 57: 1849.
- Alvarado, L. A. Actividad de proteasas en trofozoítos de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría en Ciencias. 1994.
- Argüello, R., Coral, R. M., Lascuarín, R., Ortega-Pierres, G. Respuesta inmune humoral en humanos contra antígenos de *Giardia lamblia*. Congreso de Bioquímica. Oaxaca, México. 1988.

- Arroyo, R., Alderete, J. F. The mechanism and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. Arch. Med. Res. 1995; 26: 279.
- Arroyo, R., Alderete, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. Infect. Immun. 1989; 57: 2991.
- Arroyo, R., Engbring, J., Alderete, J. F. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol. 1992; 6: 853.
- Barrett, A. J. In: Proteinase inhibitors. Barrett, A. J. and McDonald, G. (eds). Elsevier: Amsterdam. 1986. pp 3.
- Bertram, M. A., Meyer, E. A., Lile, J. D., Morse, S. A. A comparison of isoenzymes of five axenic *Giardia* isolates. J. Parasitol. 1983; 69: 793.
- Beynon R. J. y Bond, J. S. Proteolytic enzymes. A practical approach. IRL Press. 1994.
- Biagi, F. Epidemiología de la protozoosis. En: Biagi, F. Enfermedades parasitarias, México. D. F., Editorial La Prensa Mexicana. 1985: 65.
- Bingham, A. K., Meyer, E. A. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. Nature. 1979; 277: 301.
- Binz, N., Thompson, R. C. A., Limbery, A. J., Hobbs, R. P. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia lamblia* *in vitro*. Inter. J. Parasitol. 1992; 22: 195.
- Bonaldo, M. C., D'Escoffier, L. N., Salles, J. M., Goldenberg, S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Exp. Parasitol. 1991; 73: 44.
- Bond, J. S., Butler, P. E. Intracellular proteases. Ann. Rev. Biochem. 1987; 56: 333.
- Bongertz, V., Hungerer, K. D. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and characterization of a protease. Exp. Parasitol. 1978; 45: 88.

- Bontempi, E., Martínez, J., Cazzulo, J. J. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biol. Parasitol.* 1989; 33: 43.
- Boucher, S. E. M., Gillin, F. D. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cyst. *Infect. Immun.* 1990; 58: 3516.
- Bóznér, P., and Demeç, P. Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type. *Parasitol.* 1991a; 102: 113.
- Bóznér, P. and Demeç, P. Cell associated and extracellular proteolytic activity of oral flagellate *Trichomonas tenax*. *Arch. O. Biol.* 1991b; 36: 77.
- Brodsky, R. E., Spencer, H. C., Schultz, M. G. Giardiasis in American travelers to the Sovietic Union. *J. Infect. Dis.* 1974; 130: 319.
- Campbell, D., Chadee, K. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitol. Today.* 1997; 13(5): 184.
- Campetella, O., Martínez, J., Cazzulo, J. J. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Let.* 1990; 67: 145.
- Cedillo-Rivera, R., Enciso, M. J. A., Martínez, P. A., Ortega, P. M. G. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83: 644.
- Cedillo-Rivera, R., Enciso, M.J.A., Martínez, P. A., Ortega-Pierres, G. Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch. Inv. Med.* 1991; 22: 79
- Cedillo-Rivera, R. M., Ramírez, A., Muñoz, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 1992; 23(2): 59.
- Cedillo- Rivera, R., Muñoz, O. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* 1992; 37: 221.

- Colman, P. M., Jansonius, J. N., Matthews, B. W. The structure of the thermolysin: an electron density map at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1972; 70: 701.
- Craft, F. C. *Giardia* and giardiasis in childhood. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1982; 1: 192.
- Craun, G. F. Waterborne outbreaks of giardiasis. Current status. In: Earlandsen, S.S. L. and Meyer, E. A. (eds). *Giardia and Giardiasis*, Plenum Press, New York, 1986, pp 243.
- Crossley, R., Holberton, D. V. Characterization of the proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* 1983; 59: 81.
- Crouh, A. A., Seow, W. K., Thong, Y. H. Effect of twenty-three chemotherapeutic agents on the adherence and growth of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986; 80: 893.
- Chávez, B., González-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R., Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: *in vitro* cytopathic effect of human symptomatic and asymptomatic isolates. *Exp. Parasitol.* 1995; 80: 133.
- Chávez, B., Knaippe, F., González-Mariscal, L., Martínez-Palomo. *Giardia lamblia*: Electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Exp. Parasitol.* 1986; 61: 379.
- Dahmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R., Baumeister, W. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett.* 1989; 251: 125.
- Das, S., Gillin, D. F. *Giardia lamblia*: increased UDP-N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine transferase activities during encystation. *Exp. Parasitol.* 1996; 83: 19.
- DeMartino, G. N. y Croall, D. E. *News. Physiol. Sci.* 1987; 2: 82
- Dullery, J. R., Grieve, P. A. A simple technique for eliminating interference by detergent in the Lowry method of protein determination. *Ann. Biochem.* 1975; 64: 163.
- Eakin, A. E., Bouvier, J., Sakanari, J. A., Craik, C. S., McKerrow, J. H. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 39: 1.

- Edlind, T. D., Hang, T. L., Chakraborty, P. R. Activity of antihelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 1408.
- Einfield, A. David., Stibbs, H. Henry. Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1984; 46(2): 377.
- Enciso, M. J. A., Fonseca, R., Argüello, R., Cedillo, R., Ortega-Pierres, G. Recurrent variations of surface antigens in clones of *Giardia lamblia*. The 38 Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1988:163.
- Enciso, M. J. A. Obtención y caracterización de aislados de *Giardia lamblia* de individuos sintomáticos y asintomáticos. Tesis de Doctorado. 1990.
- Erlandsen, L. S., Macechko, T. P., Van-Keulen, H., Jarroll, L. E. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Euk. Microbiol.* 1996; 43(5): 416.
- Farthing, J. G., Pereira, E. A. M., Keusch, G. T. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1986; 51(2):661.
- Farthing, M. J. G. Host-parasite interactions in humans giardiasis. *Quar. J. Med.* 1989; 70: 191.
- Farthing, M. J. G. New perspectives in giardiasis. *J. Med. Microbiol.* 1992; 37:1
- Feely, D. A., Schollmeyer, J. V., Erlandsen, S. L. *Giardia*: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* 1982; 53: 145.
- Feely, D. E. Acid hydrolase cytochemistry of *Giardia*. *Microecol. Ther.* 1985; 15: 149.
- Ferguson, A., Gillon, J. y Munro, G. Pathology and pathogenesis of the intestinal mucosal damage in giardiasis. In giardiasis. Meyer E. A. (eds.) Elsevier: Amsterdam. 1990; pp 155.

- Garber, G., Lemchuk-Favel, L. T. Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Can. J. Biochem.* 1989; 35: 903.
- Gilman, R. H., Brown, K. H., Visvesvara, G.S., Mondal, G., Greenberg, B., Sack, R. B., Brandt, F., Khan, M. U. Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985; 79: 469.
- Gillin, F. D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S. B., Reiner, D. S., McCaffery, M. S. D., Guiney, D. G. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Nat.l Acad. Sci.* 1990; 87: 4463.
- Gillin, F.D., Reiner, D. S., Boucher, S. E. Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Infect. Immun.* 1988; 56: 705.
- Gillon, J., Ferguson, A. Changes in the small intestinal mucosa in giardiasis. En: Erlandsen S. L., Meyer, E. A. *Giardia and giardiasis*. Plenum Press, New York. 1984; 163.
- Goka, A. K. J., Rolston, D. D. K., Mathan, V. I., Farthing, M. J. G. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunoabsorbent assay. *Lancet.* 1986; 2: 184.
- Gosttein, Bruno., Harriman, Gregory, R., Conrad, T, Jonh., Theodore, E. Nash. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral response in a mouse model. *Parasitol. Immunol.* 1990; 12: 659.
- Greig, S., Ashall, F. Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 39: 31.
- Halliday, C. E. W., Clark, C., Farthing, M. G. *Giardia* bili-salt interactions *in vitro* and *in vivo*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1988; 82: 428.
- Hare, D. F., Jarroll, E. L., Lindmark, D. G. *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophoites. *Exp. Parasitol.* 1989; 68: 141.
- Harth, G., Andrews, N., Mills, A., Engel, J., Smith, R., McKerrow, J. H. Peptide fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 47: 821.

- Hellman, U., Wernstedt, C., Cazzulo, J. J. Self-proteolysis of the cysteine proteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its C-terminal domain. *Mol. Biol. Parasitol.* 1991; 44: 15.
- Hernández, J. Identificación de una molécula de superficie de *Giardia lamblia* de ≈200 kDa y su participación en el fenómeno de adherencia. Tesis de Doctorado. IPN, 1992.
- Hill, R. D., Hewlett, E. L., Pearson, R. D. Lectin binding by *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1981; 34(3): 733.
- Inge, P. M. G., Edson, C. M., Farthing, M. J. G. Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut.* 1986; 29: 795.
- Janoff, E. N., Taylor, D. N., Echeverría, P., Glode, M. P., Blasser, J. M. Serum antibodies to *Giardia lamblia* by age in populations in Colorado and Thailand. *West. J. Med.* 1990; 152: 253.
- Keene, E. W., Hidalgo, M. E., Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of the cysteine protease. *Exp. Parasitol.* 1990; 71: 199.
- Keene, W. E., Peattie, M. G., Allen, S., McKerrow, J. H. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 536.
- Keister, D. B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986; 77(4): 487.
- Kester, W. R., Matthews, B. W. Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the catalytic mechanisms. *Biochemistry.* 1977; 16: 2506.
- Knaippe, F. *Giardia lamblia* attachment to biological and inert substrates. *Micr. Electr. Biol. Cel.* 1990; 14 (1) 35.
- Knight, R. Epidemiology and transmission of giardiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980; 74:433.
- Korman, S. H., LeBlancq, D. T., Spira, J., Eolon, R. M. *Giardia lamblia*: identification of different strains from man. *Parasitenkd.* 1986; 72: 173.

- Korman, S. H., Bar-Oz, B., Mandelberg, A., Matoth, I. Giardiasis with protein-losing enteropathy: Diagnosis by fecal a1-antitrypsin determination. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1990; 10: 249.
- Kulda, J. and Nohynkova, E. Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In Kreir J. P (ed), *Giardiasis, Parasitic protozoa*, vol II, Academic Press, New York, 1978. pp.61
- Leippe, M., Sievertsen, H. J., Tannich, E., Horstmann, R. D. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, 1995; 111: 569.
- Lev., B., Ward, H., Keusch, T. G., Pereira, E. A. M. Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: A novel host-parasite interaction. *Science* 1986; 232: 71.
- Levine, W. Y., Stevenson, W.T., Craun, G. F. Waterborne disease outbreaks 1986-1988. *M. M. W. R.* 1990; 39 (SS1): 1.
- Lewis, P. D. Jr., Belosevic, M., Faubert, G. M., Curthoys, L., MacLean, J. D. Cortisone-induced recrudescence of *Giardia lamblia* infections in gerbils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36: 33.
- Lindmark, D. G. *Giardia lamblia*: localization of hidrolase activities in lisosome-like organelles of trophozoites. *Exp. Parasitol.* 1988; 65: 141.
- Liñán, R., Ortega-Pierres, G. Análisis de proteínas variables de superficie de *Giardia lamblia* y su participación en la adhesión del parásito a células blanco. IX Congreso Nacional de Inmunología. Monterrey, 1991.
- Lockwood, B. C., North, M. J., Coombs, G. H. *Trichomonas vaginalis*, *Tritichomonas foetus* and *Trichomitus batrachorum*: comparative proteolytic activity. *Exp. Parasitol.* 1984; 58: 245.
- Lockwood, B. C., North, M. J., Coombs, J. H. Proteolysis in trichomonads. *A. Univ. Car. Biol.* 1986; 30: 313.
- Lockwood, B. C., North, M. J., Coombs, G. H. The use of highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987; 24: 89.

- Luaces, A. L., Barret, A. J. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Biochem. 1988; 250: 903.
- Luján, D. H., Mowatt, R. M., Conrad, T. J., Bowers, B., Nash, E. T. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. J. Biol. Chem. 1995a; 270:29307.
- Luján, D. H., Mowatt, R. M., Wu, J.J., Lu, Yu., Lees, A., Chance, R. M., Nash, T. E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. J. Biol. Chem. 1995b; 270: 13807.
- Lushbaugh, WB., Hofbauer, A. F., Pittman, F. E. *Entamoeba histolytica*: Purification of cathepsin B. Exp. Parasitol. 1985; 59: 328.
- Macechko, P. T., Steimle, P. A., Lindmark, D. G., Erlandsen, S. L., Jarroll, E. L. Galactosamine synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. Mol. Biochem. Parasitol. 1992; 56: 301.
- Magne, D., Favennec, L., Chochillo, C., Gorenflot, A., Meillet, D., Kapel, N., Raichvarg, D., Savel, J., Gobert, J. G. Role of cytoskeleton and surface lectins in *Giardia duodenalis* attachment to CaCO₂ cells. Parasitol. Res. 1991; 77:659.
- Mantovani, M. P., Gaundalini, S., Ecuba, P., Corvino, C., di Martino, L., Lactose malabsorption in children with symptomatic *Giardia lamblia* infections: Feasibility of yoghurt supplementation. J. Pediatr. Gastroenter. Nutr. 1989; 9: 295-300.
- Mason, R. W. Proteinases of mammals: an overview. In: Biochemical Protozoology. Coombs, G. and North, M. (eds). Taylor and Francis: London. 1991. pp.168.
- Masson, P. R., Patterson, B. A. Epidemiology of *Giardia lamblia* infections in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 37: 277.
- Mata, L. J. The children of Santa María Cauque: a prospective field study of health and growth. MIT Press, Cambridge, Mass. 1978. pp 99

- McCabe, R. E., Yu, M. G., Contreas, C., Morril, P. R., McMorrow, B. *In vitro* model of attachment of *Giardia intestinalis* trophozoites to IEC-6 cells, an intestinal cell line. *Antimicrob. Ag. chemother.* 1991; 35(1): 29
- McKerrow, J. H., Doenhoff, M. J. Schistosome proteasas. *Parasitol. Today* 1988; 4: 334.
- McKerrow, J. H., Rosenthal, P., Sun, E., Bouvier, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 1993; 47: 821.
- McLaughlin, J., Faubert, G. Partial purification and some properties of neutral sulfhydryl and an acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can. J. Microbiol.* 1977; 23: 420.
- Meirelles, M. N. L., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S. G., Costa, E. M., Murta, A. C. M., Scharfstein, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 52: 175.
- Meloni, B. P., Limbery, A. J., Thompson, C. A. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38: 65.
- Meloni, B. P., Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., Seville, P. Albendazole: a more effective anti giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84: 375.
- Meyer, E. A. Taxonomy and Nomenclature: In giardiasis. 1990 Meyer, E. A (ed.) Elsevier: Amsterdam. pp 51.
- Meyer, E. A., Jarroll, E. L. Giardiasis. *Am. J. Epidemiol.* 1980; 111: 1
- Meyer, E. A. *Giardia* as an organism: In *Giardia* from molecules to disease. Thompson, R. C. A., Reynolson, J. A., Lymbery, A. J. (ed). CAB International. 1994. pp 6.
- Moore, G. T., Cross, W. M., Mc Guire, D., Mollohan, C. S., Gleason, M. S., Healy, G. R., Newton, L. H. Epidemic giardiasis at a sky resort. *N. Engl. J. Med.* 1969; 21:402.
- Mottram, J. C., North, M. J., Barry, J. D., Coombs, G. H. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with unusual C-terminal extension. *FEBS Let.* 1989; 258: 211.

- Mowatt, M. R., Aggarwal, A., Nash, T. E. Carboxyl terminal sequence conservation among variant specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 49: 215.
- Muñoz, M. L., Calderón, J., Rojkin, M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 1982; 155: 42.
- Narcisi, E. M., Paulin, J. J., Fechheimer, M. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J. Parasitol.* 1994; 80(3): 468.
- Nash, T. E., Aggarwal, A., Adam, R. D., Conrad, J. T., Merrit, J. W. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immun.* 1988; 141: 636.
- Nash, T. E., Conrad, J. T., Merrit, J. W. Jr. Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 42: 125.
- Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., Levine, M. M. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 1987; 156: 974-984.
- Nash, T. E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J. D., Conrad, J. D., Gillin, F. D. Restriction endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J. Infect. Dis.* 1985; 152: 64.
- Nash, T. E., Merrit, J. W. Jr., Conrad, J. T. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect. Immun.* 1991; 59: 1334.
- Nash, T. E., Mowatt, R. M. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group specific gene. *Exp. Parasitol.* 1992; 75: 369.
- Nava, S. C. S. Caracterización de proteasas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura, UNAM 1997.
- Neale, K. A., Alderete, J. F. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect. Immun.* 1990; 58: 157.
- North, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotes microorganism. *Microbiol Rev.* 1982.; 46: 308.

- North, M. J., Colin, D. R., Coombs, G. H. The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrates and specific inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990a; 39: 183.
- North, M. J., Motram, J. C., Coombs, J. H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* 1990b; 6: 270.
- Ortega-Pierres, G., Enciso, M. J. A., Fonseca-Liñán, S. R., Argüello, G. R. Caracterización de antígenos de superficie variables de *Giardia lamblia*. Cambios recurrentes y su relación con la adhesión del parásito a células epiteliales *in vitro*. XI Reunión de Investigación. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI. 1991.
- Papanastasiou, P., Hiltpod, A., Bommeli, C., Köhler, P. The release of the variant surface protein of *Giardia* to its soluble isoform is mediated by the selective cleavage of the conserved carboxy-terminal domain. *Biochem.* 1996; 35: 10143.
- Parenti, D. M. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 1989; 160: 1076-1080.
- Peattie, D. A. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitol. Today.* 1990; 6: 52.
- Peattie, D. A., Alonso, R. A., Caufield, J. P. Ultrastructural localizations of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 2323.
- Pegado, M. G. F., Souza, W. Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells *in vitro*. *Parasitol. Res.* 1994; 80: 320.
- Pérez Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velázquez Medina, L., Montfort, J., Becker, I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987; 26: 87.
- Pereira, M. E. A. Cell Biology of *Trypanosma cruzi*. In: *Modern Parasite Biology*. Ed. Wyler, D. J. Freeman. New York, 1990. pp 64
- Petersen, L. R., Cartter, M. L., Hadler, J. L.. A food borne outbreak of *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 1988; 157: 846.

- Piras, M. M., Henríquez, D., Piras, R. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*- fibroblast. Mol. Biochem. Parasitol. 1985; 14: 151.
- Que, X., Reed, S. L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. Parasitol. Today. 1997; 13(5): 161.
- Radulescu, S., Meyer, E. A. *In vitro* cultivation of *Giardia* trophozoites. In giardiasis. E. A. Meyer (ed). Elsevier, Amsterdam. 1990. pp 99.
- Radulescu, S., Rau, C., Petrasincu, D., Gaicu, N., Meyer, E. A. Behavior and cytopathogenicity of *Giardia lamblia* in cell cultures. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. T. 1980; 39: 163.
- Ramírez-Mayans, J. A. , Rivera-Echegoyen, M., Conti, E. Frecuencia de *Giardia lamblia* en las heces de 100 niños con diarrea crónica. Biol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1986, 43: 247.
- Reed, S. L., Keene, W. E., McKerrow, J. H. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Immun. 1989; 27: 2772.
- Reed, S. L., Keene, W. E., McKerrow, J. H., Gigli, I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Immun. 1989; 143: 189.
- Rose, J. B. Risk assesment and control of waterborne giardiasis. Am. J. Pub. Heal. 1991; 81: 709.
- Rosenthal, P. J., Kim, K., McKerrow, J. H., Leech, J. H. Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. J. Exp. Med. 1987; 166: 816.
- Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Alkawa, M., Nagasawa, H., Leech, J. H. A malarial cysteine proteinase is necessary for haemoglobin degradation for *Plasmodium falciparum*. J. Clin. Invest. 1988; 82: 1560.
- Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Rasnick, D., Leech, J. H. *Plasmodium falciparum*: Inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. Mol. Biochem. Parasitol. 1989; 35: 177.

- Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S., McKerrow, J. H. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 4863.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 1997; 14(37): 8.
- Souto- Padrón, T., Reyes, M. B., Leguizamón, S., Campetella, O. E., Frasch, A. C. C., De Souza, W. *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. *Eur. J. Cell. Biol.* 1990; 50: 272.
- Telch, J., Vega-Franco, L., Lara, R. Parasitosis intestinal en un hospital de concentración. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 1974; XXXI: 733.
- Udezulu, Y. A., Visvesvara, G. S., Moss, D. M., Leitch, G. J. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. *Infect. Immun.* 1992; 60: 227.
- Visvesvara, G. S., Healy, G. R. Antigenicity of *Giardia lamblia* and the current status of serological diagnosis of giardiasis. In Erlandsen S. L., Meyer, E. A., (eds) *Giardia and giardiasis*. New York: Plenum Publishers. 1984: 219.
- Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, C. J., Franklin, C., McKerrow, J. H. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell.* 1997; 89: 437.
- Ward, D. H., Keusch, G. T., Pereira, M. E. A. Induction of a phosphomannosyl binding lectin activity in *Giardia*. *Bioessays.* 1990; 12: 211.
- Ward, D. H., Lev, Y. V., Kane, V. A., Keusch, T. G., Pereira, E. A. M. Identification and characterization of taglin, a mannose 6-phosphate binding, trypsin activated lectin from *Giardia lamblia*. *Biochemistry.* 1987; 26: 8669.
- Weinbach, E. C., Takeuchi, t., Claggett, C. E., Inohue, F., Kon, H., Diamond, L.S. Role of iron sulphur proteins in the electron transport system of the *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med.* ; 11 suplemento (1):75.
- Werries, E., Franz, A., Hippe, H., Acil, Y. Purification and substrate specificity of two cysteine proteinases of *Giardia lamblia*. *J. Protozool.* 1991; 38: 378.