

11281

3
Jey



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PARTICIPACION DE LA CALMODULINA (CaM)
EN LA REGULACION DEL DESENQUISTAMIENTO
DE *Giardia lamblia***

**T E S I S
QUE PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
PARASITOLOGIA
P R E S E N T A
M. en C. ROSAMARIA BERNAL REDONDO**

266875

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F. 1998



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 esta 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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)-IPN bajo la tutoría de la Dra. Ma de Lourdes Muñoz Moreno y la asesoría del Dr. Arturo Ortega Soto, con la cotutoría del Dr. José Ignacio Santos Preciado del Laboratorio de Inmunquímica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Beca del Hospital Infantil de México Federico Gómez y de CONACYT 83876.

R E S U M E N

Giardia lamblia presenta en su ciclo biológico una fase de resistencia e infectante, el quiste y una fase parásita y patógena, el trofozoito. El quiste se pone en contacto con el huésped e inicia la infección, dentro del huésped el trofozoito emerge del quiste y coloniza el duodeno e inicio del yeyuno.

El desenquistamiento de *G. lamblia* es un proceso inducido y la pared del quiste requiere de un estímulo externo, como pH ácido y temperatura de 37°C para desencadenar una serie de eventos que culminan con la eclosión de dos trofozoitos por cada quiste. Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares que intervienen durante el desenquistamiento.

El objetivo es determinar la participación de la calmodulina (CaM) en la regulación del desenquistamiento de *G. lamblia*.

Los métodos empleados fueron: Concentración de quistes (QN). Inducción de desenquistamiento (QI). Cuantificación de CaM en QI mediante la activación de la fosfodiesterasa del AMPc. Determinación de CaM en QN y QI mediante ELISA. Localización de CaM en QI mediante IFI. Inmunodetección de CaM en QI. Empleo de antagonistas de CaM durante el desenquistamiento. Identificación de fosfoproteínas en QI. Identificación de cinasas en QI.

Resultados. La concentración de CaM de QN y QI necesaria para lograr el 50% de la activación de la fosfodiesterasa fue de 3125 y 4000 UCAM/mg de proteína, respectivamente. La lectura de densidad optica para la técnica de ELISA fue positiva por arriba del valor de corte de ≥ 0.5 . La CaM se muestra por IFI con mayor intensidad en QI y se presenta una redistribución durante el proceso de desenquistamiento. El inmunoblot con anti-CaM en QN y QI muestra dos proteínas de PM 15 y 19 kDa. Los antagonistas de CaM, TFP y W-7 inhiben la desenquistación en un 45 y 52% respectivamente. Se muestra la detección de varias fosfoproteínas de PM de 30, 45, 62, 78 y 85 kDa. Detección de proteína cinasa II de PM 51-58 kDa. Se demuestra la presencia de CaM durante el desenquistamiento de *G. lamblia*. Los antagonistas de CaM inhiben el proceso a la mitad de su actividad normal. Existe transmisión de señales mediante fosforilación durante la inducción del proceso. Se detecta la presencia de proteína cinasa II durante el desenquistamiento.

Summary

Giardia lamblia has caused a number of waterborne outbreaks of diarrhea in the United States, and it is the intestinal parasite most frequently identified in Mexican children. The *Giardia* life cycle includes a cyst, which is absolutely required for survival outside the host, as well as for initiating new infections. This protozoan initiates infection when trophozoites emerge from a cyst in the hosts by the excystation process. Although this process is crucial to the initiation of infection by *G. lamblia*, little is known about its regulation.

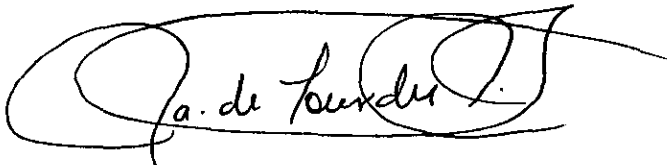
The approach taken to discern the role of CaM in regulation of *G. lamblia* excystation was to test: a) immunodetection and immunocytochemical localization of CaM itself; b) CaM activity through the activation of brain phosphodiesterase activity by the parasite protein in excystation stages I and II; and c) the effect of several CaM antagonists (TFP, W-7 and W-5).

Western-blot analysis showed that antibodies against bovine testis CaM recognized two polypeptides with apparent molecular weights of 15 and 19 kDa. Immunofluorescence assays using these specific antibodies showed that CaM was redistributed after induction of excystation. These results are important, since drugs that inhibit excystation could impair this cellular process and, therefore, block infection.

Excystation of stage I was inhibited in intact trophozoites by CaM antagonists TFP and W-7, W-5 that is similar to W-7 but does not inhibit CaM did not have any effect on excystation. The protein kinase C inhibitor H-7 had no effect on excystation, suggesting that CaM antagonists acted by selectively inhibiting CaM.

Furthermore, it was shown the phosphorylation of proteins with apparent molecular weights of 30, 45, 62 and 85 kDa. In addition, the multiprotein kinase II was identified by western-blot analysis using specific antibodies against this protein.

These results suggest that a CaM-dependent process is involved in *G. lamblia* excystation. Further research is required to determine the exact mechanisms of inhibition.



J. de Lencastre

I N D I C E

INTRODUCCION	PAGINA
Frecuencia y Transmisión	1
Morfología y Composición del quiste	2
Desenquistamiento	7
Calmodulina (CaM)	11
Funciones mediadas por Ca ²⁺ -CaM	14
Calmodulina en Parásitos	19
Antagonistas de CaM	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPOTESIS	30
OBJE TIVOS	30
MATERIAL Y METODOS	
Quistes de <i>Giardia lamblia</i>	31
Concentración, Purificación y Cuantificación de Q	31
Porcentaje de Viabilidad de los Quistes	33
Inducción "in vitro" de Desenquistación	33
Eclosión de los Trofozoitos	33
Determinación de Proteínas en Extractos de Q	35
Cuantificación de CaM mediante la Activación de la Fosfodiesterasa del AMPc	35
Anticuerpos Policlonales de Borrego anti-quiste	37
Extracción de CaM Bovina	38
Anticuerpos policlonales de Conejo anti-CaM	39
Anticuerpos policlonales de ratón anti-CaM	39

Precipitación de gamaglobulinas de borrego, conejo y ratón	39
Quantificación de anticuerpos por el ensayo inmuno ensimático indirecto (ELISA)	40
Anticuerpos de borrego anti-quiste	40
Anticuerpos de conejo y ratón anti-CaM	41
Detección de CaM por ELISA en QC, QI y QIMC	41
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	42
anti-quiste	43
anti-CaM	43
Tratamiento de QC y QI con Antagonistas de CaM e Inhibidores de PKC	44
Quistes completos	44
Quistes inducidos	45
Quantificación del Porcentaje de Desenquistamiento y Viabilidad	45
Inmunofluorescencia indirecta con anti-CaM en Q. tratados con Compuestos anti-CaM y anti-PKC	46
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	47
Electrotransferencia de extractos de QC, QO y QIMC	48
Inmunodetección de CaM en QC y QI por electro- transferencia en papel PVDF	49
Identificación de Fosfoproteínas en Diferentes Tiempos de Inducción de Desenquistación	50
Autorradiografía	51
Detección de Fosfoproteínas de QC, QI y QIMC	51

Evaluación de la participación de CaM en el proceso de Desenquistamiento (Fig. 7A-B) (Tabla 3)	68
Efecto de los Antagonistas de CaM durante la eclosión de los Trofozoitos de <i>G. lamblia</i> (Fig. 7C-D)	71
Fosfoproteínas de Quistes con diferentes tiempos de inducción de Desenquistamiento (Fig. 8A-B)	72
Fosfoproteínas de QC, QI Y QIMC en Condiciones Normales (Fig. 9A-B)	72
Fosfoproteínas de Quistes Permeabilizados (Fig. 10)	75
Fosfoproteínas de Quistes Tratados con RIPA (Fig. 11)	77
Fosfoproteínas de Quistes Tratados con TPA Inmunodetección de Fosfotirosina (Fig. 12)	78
Inmunodetección de Proteína Cinasa II (Fig.13)	80
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFIA	96

I N T R O D U C C I O N

Giardia lamblia (Stiles, 1915) (Sarcocystidophora-Hexamitidae) protozooario flagelado con distribución mundial. Es un agente patógeno del tubo digestivo puede ser causante de infección asintomática, diarrea aguda (Thompson y cols, 1993), diarrea de larga evolución o trastornos en la absorción de grasas, vitaminas liposolubles y vitamina B₁₂ (Vega y cols, 1982; Tolbom y cols, 1987). La presencia de los trofozoitos adheridos a la mucosa intestinal a través de su disco puede resultar en daño a las microvellosidades de los enterocitos y alterar la absorción de nutrientes, que a largo plazo da como consecuencia la disminución en peso y talla, principalmente en niños y niñas de edad preescolar y escolar (Thompson y Reynoldson, 1993). Sin embargo, la patogénesis de la giardiosis es compleja e involucra factores del parásito y del huésped, ya que un porcentaje elevado de individuos infectados con *G. lamblia* desarrollan la infección pero permanecen asintomáticos (Vega y cols, 1975; Thompson y cols, 1993).

FRECUENCIA Y TRANSMISION

La prevalencia de la giardiosis en la población infantil mexicana de diferentes estados del país ha sido estimada a través de exámenes coproparasitológicos (CPS). Los resultados obtenidos son muy variables, desde el 14.0% (Alonso, 1983), 28.9% (Cázares y González, 1985), 44.5%

(Bernal, 1994) hasta el 70.0% (Salazar y cols, 1988) sin embargo ocupa siempre el primero o segundo lugar en reportes de prevalencia. Estudios clínicos y parasitológicos en guarderías señalan de un 35% a un 47% de prevalencia, lo que permite colocar a la giardiosis como la parasitosis de la infancia (Arellano y Prieto, 1972; Rauch y cols, 1990).

La infección por *Giardia* se inicia con la ingestión de quistes tetranucleados expulsados en la materia fecal, que contaminan el agua y los alimentos. Los quistes, a pesar de haber sido observados y dibujados por Lambl y Grassi en la mitad del siglo pasado, no fueron identificados como participantes en la dinámica de transmisión de la giardiosis hasta cuarenta años después. Se atribuye a Perroncito en 1887 el haber relacionado a los quistes con los trofozoitos del flagelado en individuos con diarrea al describirlos como ..."*pequeños cuerpos redondos u ovaes que muestran contenido celular y en medio se distingue un flagelo*" . Estas observaciones le permitieron a Perroncito sostener que las heces podían contener organismos en diferentes estados de desenquistamiento y enfatizó que los quistes estaban destinados a mantener vivo al parásito y a facilitar su diseminación (Perroncito, 1887).

MORFOLOGIA Y COMPOSICION DEL QUISTE DE *Giardia lamblia*

Los quistes de *G. lamblia* aislados de heces de humano son ovoides o elípticos, miden aproximadamente de 7 a 10 μm

pueden ser eliminados en cantidades de 10,000 a 24 millones por gramo de heces (Velázquez, 1989). Las observaciones por microscopía de luz describen al quiste con cubierta suave y lisa, sin perforaciones, poros, depresiones o arrugas y de naturaleza flexible (Luchtel y cols, 1980).

Desde 1965 se demostró la presencia de polisacáridos en la pared del quiste mediante técnicas histoquímicas, como carmín de Best, ácido periódico-Schiff (PAS), tinciones que podrían ser inhibidas por el empleo de la amilasa y la maltasa de la saliva (Dutta, 1965a y 1965b). Estas observaciones correlacionan con estudios recientes, realizados mediante cromatografía de gases y espectrometría de masa (Manning y cols, 1992). La dificultad para teñir quistes con tinciones especiales para quitina como la de Zander, Kuhvelt y Feulgen, apoya el argumento de que la quitina no es el principal componente de la pared. La capa externa de la pared del quiste, con un espesor de 0.3 a 0.5 μm , está estrechamente unida a la membrana citoplasmática (Friend, 1966). Estudios de microscopía electrónica de barrido muestran detalles de la superficie del quiste, como son fibras finas arregladas en sentido curvo, de 7 a 30 nm de ancho y de longitud indeterminada. Aunque los trabajos de Ward en 1985 demostraron, mediante el empleo de quitinasa y lectinas, que la pared del quiste está constituida por un polímero de N-acetilglucosamina, principal constituyente de la quitina (Ward y cols, 1985). Sin embargo, Jarroll (1989) utilizando técnicas de cromatografía de gases y

espectrometría de masa, señala que el principal carbohidrato presente en la pared del quiste es la galactosamina y que integra un polímero de N-acetil- galactosamina; similar a lo encontrado en las esférulas y microquistes de Myxomicetos, que no se reducen con el tratamiento con amiloglucosidasa o enzimas proteolíticas. La poca cantidad de N-acetil- glucosamina detectada no apoya la propuesta de que la quitina sea el mayor componente de la pared. Este estudio corrobora la dificultad de teñir los quistes con las tinciones específicas para quitina. La glucosa parece formar parte de un polímero lábil a la amiloglucosidasa o como residuo de una digestión incompleta del polímero, es principalmente un componente interno del quiste. Existen además otros carbohidratos como xilosa, ribosa y manosa que pueden ser constituyentes de glucoproteínas o proteoglicanos (Jarroll y cols, 1989 y 1989).

En 1993 Paget reportó la presencia de glucosa en el interior del quiste como parte de un polímero de glucógeno y demostró que el quiste, antes considerado como criptobiótico, es metabólicamente activo y que la actividad respiratoria es a expensas de la glucosa endógena y no de la glucosa exógena. La mayor cantidad de glucosa en el interior del quiste, hace suponer que esta hexosa no sea el principal componente de la pared (Paget y cols, 1993).

Estudios mediante cromatografía líquida de alta presión permitieron determinar la glucosa de quistes intactos de *G. muris* en una concentración de $72.5 \text{ nmoles}/10^6$ quistes, que

corresponde al 41.2% del total de nmoles de carbohidratos (Manning y cols, 1992).

Trabajos de Macechko y cols sobre el enquistamiento de *G. lamblia*, revelaron que los trofozoitos sintetizan la mayor cantidad de N-acetil-galactosamina a partir de la glucosa endógena, a través de la participación de una gran cantidad de enzimas que son activadas en el lapso de 20 a 24 horas después de inducir la enquistación. En éste proceso están incluídas la glucosamina 6 fosfato isomerasa, la glucosamina 6 fosfato N-acetilasa, la UDP N-acetil glucosamina pirofosforilasa y la UDP N-acetil-glucosamina 4'epimerasa. Estos trabajos proponen la ausencia de N-acetil-galactosamina en trofozoitos y demuestran que éste polímero es sintetizado, unicamente en el momento de la enquistación. La síntesis de este azúcar se ha propuesto como una "llave bioquímica" para la enquistación (Macechko y cols, 1992).

El interés en el conocimiento de los componentes moleculares de la pared del quiste ha permitido, mediante el uso de la cromatografía líquida de alta presión, dar evidencias sobre la presencia de proteínas como parte estructural de ésta y sugieren que éstos péptidos están estrechamente unidos a los carbohidratos, lo cual dificulta su extracción.

Las proteínas en la pared del quiste se han identificado como polipéptidos con peso molecular de 21 a 108 kDa, que hacen su aparición durante el proceso de enquistamiento (Reiner y cols, 1989 y 1990).

Además de la identificación de carbohidratos y de polipéptidos como componentes esenciales, estudios que utilizan técnicas de microscopía electrónica de barrido de bajo voltaje de quistes expuestos a cloroformo y metanol, no han demostrado cambios importantes en la pared después del tratamiento, lo que sugiere que los lípidos no juegan un papel importante como integrantes estructurales de la pared del quiste. Estos resultados apoyan los datos obtenidos por Kofoid quien desde 1932 reportó la poca tinción de los quistes con colorantes de lípidos como Sudan IV, y confirmado por la insolubilidad de los quistes en éter, cloroformo, xilol y cianuro de potasio (Manning y cols, 1992).

Los quistes bi y tetranucleados de *G. lamblia* (*G. duodenalis*) o *G. muris*, albergados en el tubo digestivo del huésped, cuando son observados por microscopía electrónica de transmisión muestran organelos subcelulares similares a las que presentan los trofozoitos. Durante el enquistamiento, el citoesqueleto del disco adhesivo, constituido de tubulina y giardinas, se fragmenta y se esparce en el citoplasma. Los axonemas y flagelos son vistos como líneas continuas casi siempre centrales y se muestra la disposición de 9+2 de los microtúbulos. No se ven cuerpos mediales, que aparentemente desaparecen durante el enquistamiento, aunque las observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión han mostrado estructuras similares. Asimismo se aprecian segmentos de retículo endoplásmico rugoso y cuerpos basales con disposición 9+0.

Los quistes binucleados inmaduros o tetranucleados ya maduros contienen de 2 a 4 núcleos en un extremo. En la periferia se localiza un arreglo de vacuolas con tamaño de 300 a 400 nm, similares a las de trofozoitos, que también son positivas a la tinción con la fosfatasa ácida. (Feely y cols, 1984 y Feely y Dyer, 1987).

Morfológicamente, los quistes de *Giardia* de diferentes huéspedes son indistinguibles entre sí. Debido a esto antígenos preparados a partir de quistes y anticuerpos poli y monoclonales anti-quiste, se han utilizado comunmente para pruebas diagnósticas, lo cual ha permitido demostrar que no existen diferencias antigénicas entre los quistes, de acuerdo al origen de éstos. Esto último sugiere que podrían ser empleadas para diferenciar al grupo de *G. duodenalis*, que incluye a *G. lamblia* parásito del hombre, del grupo murino representado por *G. muris* (Sterling y cols, 1988; Stibbs y cols, 1988).

DESENQUISTAMIENTO

El tránsito de los quistes tetranucleados por el estómago del huésped, con un pH ácido y temperatura de 37°C, induce el desenquistamiento, el cual culmina en el duodeno, a un pH de 6.8 a 7.2, con la liberación de dos trofozoitos por cada quiste ingerido, (Hegner, 1927a).

Las bases del conocimiento actual sobre el proceso de desenquistamiento, fueron establecidas por Simon en 1921, quién propuso que las formas móviles flageladas presentes en

las heces, emergían de quistes localizados en el tubo digestivo (Simon, 1921).

Ensayos en modelos animales, de hace setenta años, señalaron que el sitio de desenquistamiento se localiza de 30 a 60 cm después del estómago, dentro del intestino delgado, sin definir las condiciones del proceso (Hegner, 1925 y 1927b).

Un gran paso en el estudio de la desenquistación se logró en 1979 cuando el proceso pudo ser reproducido "in vitro", en condiciones controladas como pH, temperatura y potencial de óxido-reducción. Estos factores resultaron indispensables para lograr la eclosión de los trofozoitos en el laboratorio, lo que permitió estudiar el desenquistamiento con detalle (Bingham y Meyer, 1979; Gillin y Diamond, 1981b; Schaefer y cols, 1980; Boucher y Gillin, 1990).

El resultado de gran número de estudios "in vitro" permiten proponer que la citocinesis de los trofozoitos, previa a la eclosión, se inicia con una gran actividad dentro del quiste, en donde los núcleos se encuentran claros y polarizados, y en el extremo opuesto se produce un alargamiento en forma de "burbuja". Los primeros flagelos emergen con gran movilidad, y de cinco a treinta minutos después, se observan los trofozoitos libres en el medio de cultivo (Bingham y Meyer, 1979; Gorts y cols, 1984; Feely, 1986; Ponce y cols, 1989; Bernal, 1990; Feely y cols, 1991).

A la observación detallada de la citocinesis, se agregaron el conocimiento de otros fenómenos, como la

secreción de material mucoide del interior del quiste que sucede únicamente durante la eclosión de los trofozoitos en el caso de *G. lamblia*, aunque su función no está clara (Bingham y Meyer, 1979). En el caso de *G. muris* se reporta la presencia de un material de composición química desconocida, que fluye sobre la membrana del trofozoito y posiblemente presenta una actividad enzimática. Se ha propuesto que este material aunado a la acción de los flagelos y de unas estructuras membranales parecidas a microvellosidades, localizadas en la membrana citoplásmica por debajo de la pared del quiste, tienen acción sobre el sitio de la eclosión de los trofozoitos (Feely y cols, 1984; Coggins y Schaefer, 1984 y 1986; Meyer y Schaefer, 1984). Los flagelos son las primeras estructuras que aparecen durante el desenquistamiento, al actuar sobre la pared del quiste amplian la apertura para ayudar a la salida de los trofozoitos (Schaefer y cols, 1984).

Agregada a la acción mecánica de los flagelos, para el caso de *G. lamblia* se describe también la presencia de microesférulas en la zona en dónde se inicia el desenquistamiento. Se desconoce la naturaleza química de las microesférulas, sin embargo se ha propuesto que participan en el adelgazamiento y digestión enzimática local de la pared del quiste, después de la abertura inicial. Las observaciones mediante microscopía electrónica de barrido permiten hacer dos propuestas: primero que existe una digestión enzimática

local y segundo que se presenta una acción mecánica por parte de los flagelos recién formados (Buchel y cols, 1987).

En contraste, otros investigadores que emplearon metodologías de microscopía electrónica de alta resolución, proponen que la pared quística de *G. muris*, *G. duodenalis* y *G. psittaci* está constituida por filamentos y sufre un rearrreglo en el momento de la desenquistación. En los quistes íntegros la pared quística se encuentra formada por estructuras filamentosas muy compactas de 7 a 20 nm denominada " *malla compacta*". Cuando los quistes sufren la inducción de desenquistación, se lleva a cabo una disociación en el sitio de inicio del proceso, como "*malla desatada*", con el propósito de facilitar la salida de los trofozoitos. Asimismo estas observaciones muestran la presencia de vesículas electrodensas en la periferia, por debajo de la pared quística, que sugiere la existencia de una función enzimática local (Erlandsen y cols, 1989).

La desenquistación "in vitro" puede inhibirse con el empleo de anticuerpos policlonales anti-pared del quiste y anti-aglutinina de germen de trigo y permite proponer que, posiblemente, la interferencia sea con el ácido siálico de las glucoproteínas de la pared del quiste (Meng y cols, 1996).

Recientemente se describió la presencia de una tiol-proteinasa o cisteína-proteasa en la periferia de la membrana citoplasmática del quiste de *G. lamblia*, que es liberada al exterior durante el proceso de desenquistamiento. La

desenquistación puede ser bloqueada por inhibidores específicos de la proteasa de una manera dosis-dependiente. Además se ha identificado uno de los tres genes para cisteína-proteasa, que muestra gran actividad proteolítica (Ward y cols, 1997)

Desde las primeras descripciones, a principios de siglo en modelos animales, se demostró que la desenquistación culmina con la liberación de dos trofozoitos por cada quiste ingerido; y los ensayos "in vitro" permitieron obtener una descripción detallada de la eclosión de los trofozoitos. Sin embargo hasta el momento se desconocen los mecanismos intracelulares que intervienen en este proceso biológico.

CALMODULINA (CaM)

La CaM es una proteína intracelular considerada como la principal aceptora de calcio (Ca^{2+}), identificada por Cheung como el "activador de la fosfodiesterasa" en los años 60 (Cheung y cols, 1978). Esta proteína tiene cuatro veces una estructura de hélice-asa-hélice, por lo que pertenece a la familia de las denominadas "EF Hands"; está presente en todas las células eucariotas, hasta el momento estudiadas. Al igual que otras proteínas que unen Ca^{2+} , CaM sufre un cambio conformacional y expone dos dominios hidrofóbicos que le permiten la interacción con diversas enzimas (Cheung, 1982).

Las descripciones físico-químicas de CaM purificada de testículos y cerebro bovino o murino, son utilizadas como referencia para describir la CaM de otras células eucariotas.

Calmodulina es una proteína ácida con un punto isoelectrico bajo de 3.9. Tiene un peso molecular de 16,700 daltones, está constituida por una sola cadena polipeptídica de 148 aminoácidos, con un primer residuo de alanina acetilada en el extremo N-terminal, una lisina trimetilada en la posición 115, carece de cisteína y triptofano. Presenta cuatro dominios de unión al calcio cada uno con 12 residuos de aminoácidos, separados por regiones de alfa hélice. El primer dominio va del residuo 20 al 31, el segundo del 56 al 67, el tercero del 93 al 104 y el cuarto del 129 al 140. Como característica tiene una fenilalanina (Phe) al inicio del dominio I y III y otra al final del dominio II y IV. Es una molécula con una configuración alfa helicoidal del 40% en ausencia de Ca^{2+} y que aumenta al 50% en presencia de Ca^{2+} (Watterson y cols, 1980).

Para estudios filogenéticos de homología entre las CaMs de diversas especies, se traza una línea imaginaria que divide a la molécula en cuatro partes iguales y se comparan las similitudes y diferencias de los residuos de las cuatro regiones que corresponden a los dominios que unen Ca^{2+} . Esta estrategia de estudio permitió conocer que el 70% de los aminoácidos de los dominios I y III, II y IV son idénticos (Watterson y cols, 1980; Cheung, 1982; Wylie y Vanamam, 1988).

Se ha demostrado que la CaM es una proteína altamente conservada en células eucariotas de diferentes especies animales, vertebrados e invertebrados. Tiene una secuencia de

aminoácidos similar y la identidad sólo difiere en un 10% (Baba y cols, 1984)

Una célula normal contiene, aproximadamente, 1×10^7 moléculas de CaM y puede constituir hasta el 1% del total de la proteína de la célula. Se ha purificado de diferentes tejidos como: cerebro, corazón, testículos, útero y eritrocitos de mamíferos (Gopalakrishna y Anderson, 1982; Baba y col. 1984). Las propiedades físico-químicas de la CaM se conservan aún después de la extracción de ésta, siendo similares en las diferentes especies animales, aunque no idénticas biológica y bioquímicamente (Jamieson y Vanaman, 1979; Means y cols, 1982; Wylie y Vanaman, 1988).

Las propiedades principales son: su termoresistencia (ebullición durante cinco minutos); el soportar la desnaturalización con urea al 8M, detergentes, altas concentraciones de sales, pH ácido y carecer de una función enzimática (Brostrom y Wolff, 1981; Brady y col 1985).

Calmodulina no es una proteína exclusiva de eucariotes animales, sino que ha sido aislada de numerosos organismos vegetales. Se ha reportado la estructura primaria de la calmodulina de *Arabidopsis thaliana* extraída de membrana y del citoplasma, también se ha clonado y secuenciado el gen que la codifica (Trewavas y Gilroy, 1991).

La localización de CaM depende de la concentración intracelular de Ca^{2+} , CaM migra hacia el nivel en donde se incrementó el Ca^{2+} esto se ha demostrado en células estimuladas con factores de crecimiento y en el

espermatozoide de Guinea pig, durante la reacción acrosomal (Trejo y Mújica, 1990).

Al inicio de los estudios de CaM se le consideró como una proteína citosólica, pero posteriormente se identificó también su presencia en el núcleo. La CaM sin calcio, se mueve del núcleo al citoplasma y visceversa mediante un acarreador que la reconoce en su forma libre (Pruschy y cols, 1994). En el núcleo CaM participa en la regulación del citoesqueleto nuclear y en la modulación de la expresión genética, tanto a nivel de la transcripción como a nivel del procesamiento del RNA mensajero, y otras funciones desconocidas. La concentración de CaM nuclear fluctúa entre de 0.35 a 1.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, está localizada en la región heterocromática, eucromática, en el nucleolo y en las partículas de riboproteínas (Bachs y cols, 1992 y 1994).

FUNCIONES MEDIADAS POR Ca^{2+} -CaM

La concentración intracelular de Ca^{2+} en condiciones basales se mantiene alrededor de 1×10^{-7} M en comparación a la concentración que alcanza en el medio extracelular, que es del orden de 1×10^{-3} M. En células activadas la concentración de Ca^{2+} libre aumenta de 1 a 10 μM ya sea por entrar del medio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} en la membrana, o por ser movilizado de las reservas intracelulares mantenidas en el retículo endoplásmico. La señal de Ca^{2+} es traducida en una respuesta intracelular mediada por las proteínas que la unen (Klee, 1988; Crivici y Ikura, 1995).

La CaM libre interacciona con los iones de calcio, que se unen a los cuatro dominios presentes en la molécula, la CaM activada (Ca^{2+} -CaM) cambia su conformación y expone dos dominios hidrofóbicos, que interactúan con las enzimas dependientes de ellas; en ese momento la formación del complejo Ca^{2+} -CaM es probablemente el encendido/apagado de la molécula (Stoclet y cols, 1987) Otra propuesta menciona que la unión de CaM libera una parte inhibitoria de otro sitio activo preformado (Vogel, 1994).

El complejo Ca^{2+} -CaM participa como mediador de diversas funciones dependientes de Ca^{2+} , que se pueden clasificar en siete grupos:

I) Metabolismo de nucleótidos cíclicos. La síntesis y degradación del adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y el guanidin monofosfato cíclico (GMPC) es regulada a través de la adenilato ciclasa, enzima con dos dominios citoplásmicos y dos membranales, de tipo glucoprotéico con PM aparente de 115 a 180 kDa que tiene como sustrato al adenosin trifosfato (ATP) y la fosfodiesterasa que actúa sobre su sustrato, el AMPC, cuando aumenta la concentración intracelular para degradarlo a fosfato inorgánico (Pi), ambas son incrementadas por el complejo Ca^{2+} -CaM. (Stoclet y cols, 1987)

II) Fosforilación de proteínas. Muchas enzimas dependientes de CaM son frecuentemente sensibles a ser fosforiladas por cinasas serina/treonina, algunas de sustratos específicos y otros poco específicos con baja o alta afinidad. Proteína-Cinasa I, Multiproteína-Cinasa II, Proteína-Cinasa III,

Proteína-Cinasa IV, Proteína-Cinasa V, Cinasa de las Cadenas Ligeras de la Miosina y Fosforilasa B Cinasa (Vogel, 1994; Crivici y Ikura, 1996).

III) Transduccion de señales y Control de la expresión genética. La transmisión transmembranal de señales está mediada por una red de proteínas en donde participan diferentes cinasas, cuyo objetivo final es activar una respuesta celular específica. A la fecha han sido identificadas cinco diferentes vías de transducción de señales intracelulares (Schulman, 1984 y 1993). Dentro de las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM involucradas en la transducción de señales, la multiproteína cinasa II (MPK-II) tiene un papel muy importante (Baitinger y cols, 1990); esta cinasa está ampliamente distribuida en eucariotes inferiores y superiores, responde al estímulo de muchas hormonas, neurotransmisores y participa en una amplia variedad de procesos (Taylor y Adams, 1992). Posee la capacidad de autoregularse y la unión al complejo Ca^{2+} -CaM la convierte en una cinasa activa, fosforila a proteínas como la proteína 1, proteína básica miélinica, proteína de las cadenas ligeras de miosina, triptofano monooxygenasa, MAPs y la β tubulina sobre residuos de serina y treonina (Goldenring y cols, 1983; Wandosell y cols, 1986). Asimismo el compuesto (KN-62) [1- [N,O,bis (1,5 isoquinoleina sulfonil) -N-metil-L-tirosil] -4-fenilpiperacina], inhibe la unión de la cinasa, esta propiedad ha sido empleada para identificar procesos

biológicos ligados a la cinasa MPKII (Hidaka y Kobayashi, 1992). La cadena de fosforilación en la que participa la multiproteína cinasa II/Ca²⁺-CaM llega hasta el núcleo y ocasiona la activación de CREB, una proteína que es un factor positivo de la transcripción, esto puede ser a través de la fosforilación en el sitio activo de la serina 133. También la proteína CREB puede ser activada por otra vía mediante la proteína cinasa dependiente del AMPc (PKA) (Sheng y cols, 1990 y 1991; Herschman, 1991).

IV) Desfosforilación de proteínas. Específicamente ha sido reportada la presencia de calcineurina, una fosfatasa dependiente de Ca²⁺/CaM, la mayor proteína en cerebro (Crivici y Ikura, 1995), también localizada en el núcleo de células levaduriformes de *Saccharomyces cerevisiae*, identificada mediante ¹²⁵I CaM. (Hiraga y cols, 1993). Y la Fosfatasa 11b.

V) Transporte de Ca²⁺. CaM participa en el control de la concentración intracitoplasmática de Ca²⁺ libre a través de la estimulación de tres diferentes sistemas de transporte: 1) La ATPasa-(Ca²⁺- Mg²⁺) de membrana plasmática que es estimulada directamente por Ca²⁺-CaM. 2) La ATPasa-Ca²⁺ del retículo endoplásmico que es estimulada por la fosforilación del fosfolambam que activa a esta enzima. 3) Por estimulación del intercambiador Na²⁺/Ca²⁺ de membrana plasmática y la fosforilación de la proteína cinasa II/Ca²⁺-CaM (Vogel, 1994).

VI) Control del Citoesqueleto. En los mecanismos de contracción de músculo liso, participa la fosforilación de la miosina, catalizada por la cinasa de las cadenas ligeras de

la miosina (MLCK) y en movilidad y morfogénesis (Upton y Moss, 1992)

VII) Ciclo celular. Técnicas como la inyección de un péptido inhibidor selectivo de la MPKII/Ca²⁺-CaM y el empleo de anticuerpos monoclonales anti-MPKII, permiten poner de manifiesto la participación de esta cinasa en el rompimiento de la membrana celular y la formación del uso mitótico, cuando se inyectan estos inhibidores se retarda el rompimiento de la membrana nuclear (Baitinger y cols, 1990). Múltiples estudios han demostrado la necesidad de Ca²⁺ para la proliferación y crecimiento celular, la calmodulina juega un papel importante en la regulación de Ca²⁺ durante la fase S y la fase M de la proliferación, la expresión de genes, la replicación de DNA y la citoquinesis (Takuwa y cols, 1995, Chafouleas y cols, 1982).

El uso de cepas mutantes ha sido de gran utilidad para determinar la funcionalidad de la molécula de CaM, un ejemplo es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuando de las ocho fenilalaninas (Phe) localizadas en la región hidrofóbica de la CaM activada, siete de ellas son cambiadas por alanina, éstas mutaciones alteran la funcionalidad del complejo Ca²⁺-CaM en el momento de su interacción con diferentes enzimas (Oyha y Anraku, 1989, Oyha y Botstein, 1994):

CALMODULINA EN PARASITOS

Plasmodium falciparum. En el caso de *Plasmodium falciparum*, agente etiológico de la malaria, la formación del complejo Ca^{2+} -CaM es un prerequisite indispensable para el crecimiento del parásito en cultivo. La concentración de CaM, en un millón de eritrocitos no parasitados es de 11.2 ng, mientras que en el mismo número de eritrocitos que contienen trofozoitos en la fase de "anillo", el valor aumenta a 17.8 ng y para los eritrocitos parasitados con esquizontes maduros, la concentración se eleva a 23.3 ng; esto fue determinado mediante la técnica de radioinmunoensayo (Matsumoto y cols, 1987). Asimismo, la microscopía electrónica de barrido muestra que la CaM se localiza en el complejo apical, dentro de las roptrias de los merozoitos, estructuras que participan en la penetración activa del parásito a los eritrocitos (Scheibel y cols, 1987). La ciclosporina A (CsA) a concentraciones de 0.65 μM inhibe la penetración del parásito a la célula huésped, esto ha sugerido que la CsA bloquea la región hidrofóbica de la molécula de CaM e impide su interacción con enzimas como adenilato ciclasa y proteínas cinasas. Estos resultados sugieren que la penetración del parásito a la célula huésped es un proceso dependiente de Ca^{2+} -CaM (Matsumoto y cols, 1987).

En publicaciones recientes se reportó el aislamiento de un gen de proteína cinasa de *P. falciparum*, en el cual la cinasa y una proteína parecida a CaM, están combinadas en un

mismo polipéptido lo que sugiere que la participación de CaM en el proceso invasivo de los merozoítos de *P. falciparum* pudiera darse a través de esa cinasa, en la cual la región carboxilo-terminal de ésta, presenta una secuencia de 32 a 38% de aminoácidos similares a CaM. (Zhao y cols, 1994).

El gen de CaM de *P. falciparum* clonado y secuenciado en 1991, fue descrito como una copia simple sobre el cromosoma 14 con un solo intron, posteriormente el mismo autor mediante amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) describió la naturaleza polimórfica del intron del gen de CaM y señaló que éste tiene cuatro "motifs" de repetición (Robson, 1993).

Trypanosoma brucei rhodesiense. La calmodulina de los tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma brucei rhodesiense* corresponde al 0.3% de proteína total del parásito. Tiene un peso molecular aparente de 13.5 kDa, es física y funcionalmente diferente a la CaM de la célula huésped de PM 16.5 (Ruben y col 1983 y 1984). La estructura primaria de la CaM de *T. brucei rhodesiense* difiere con la CaM bovina en los residuos 99 (Phe), 108 (Ile) y 115 (lisina) este último no se encuentra trimetilado (Walter y Opperdoes, 1982).

Trypanosoma cruzi. Para el caso del agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la CaM de los epimastigotes tiene un PM de 16.0 kDa y carece de la metilación en la lisina 115 (Goncalves y cols, 1980; Orr y cols, 1992;). En *T. cruzi*, se ha logrado la extracción de varias proteínas dependientes de Ca^{2+} -CaM, con un PM de 20 a 200 kDa, cuya identificación se

llevó a cabo por clonación de los genes específicos. Estas proteínas sólo están expresadas en las fases de división de epimastigote y amastigote y parecen estar relacionadas con la diferenciación y crecimiento del parásito. La CaM también participa en el movimiento flagelar de los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos y se le ha implicado en el recambio antigénico del parásito en su fase sanguínea (Tellez-Iñón y cols, 1985).

La Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa ha sido caracterizada en vesículas de la membrana plasmática de epimastigotes de *T. cruzi* y parece ser dependiente de la CaM endógena del parásito (Benaim, 1991). La movilización endógena de Ca^{2+} en *T. cruzi* es utilizada por el parásito durante su ciclo de vida, pero también emplea el Ca^{2+} de la célula huésped para la multiplicación de la fase intracelular de amastigote del parásito (Salazar, 1995). El gen de la CaM ha sido clonado en *T. cruzi*, el locus de CaM contiene tres regiones idénticas arregladas en repetición (tandem) y una región intergénica que difiere en sólo tres nucleótidos, mientras la región 3' del tercer gen de CaM es diferente (Ajioka y Swindle, 1993).

Naegleria sp. Se ha propuesto que en ambas de vida libre como *Naegleria gruberi* la CaM interviene en la integración del citoesqueleto durante la transformación de la célula amiboide en célula flagelada. En el ciclo biológico del parásito de 10 a 15 minutos después de iniciada la transformación aparece un mRNA funcional para α y β tubulina que se coordina con la presencia de mRNA de CaM-1 flagelar,

probablemente del 70 al 90% de la tubulina estructural del citoesqueleto del flagelo se origina por síntesis de novo. El producto del IV mRNA es una proteína estable que une calcio y comigra con la CaM-1 flagelar, ésta muestra gran homología de nucleótidos con la CaM bovina (Shea y Walsh, 1987).

Leishmania donovani. Existen pocos estudios sobre la presencia de CaM en el parásito intracelular del sistema retículo endotelial, *Leishmania donovani*, sólo se conoce que en la fase de amastigote dentro de los macrófagos, se presenta un efecto citotóxico por parte de la trifluoperazina (TFP), antagonista de CaM. Además, antagonistas de cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM inhiben la proliferación de promastigotes de *L. donovani* en cultivo axénico, esto hace suponer la participación de cinasas/ Ca^{2+} -CaM en el proceso (Pearson y cols, 1982).

Giardia lamblia. La caracterización de CaM también se ha realizado en los protozoos parásitos del tubo digestivo, tales como *G. lamblia* (Muñoz y cols, 1987) y *E. histolytica* (Muñoz y cols, 1991). Se ha encontrado que los trofozoitos de *G. lamblia*, contienen 45.0 ng de CaM/mg de proteína total, cuantificada mediante el método de radioinmunoensayo. La separación electroforética de los sobrenadantes muestra una comigración de la proteína purificada de *G. lamblia* y la CaM de cerebro bovino que sugiere una banda con un peso molecular de 19,000 daltones. Sin embargo el análisis de aminoácidos da un peso molecular aparente de 16.8 kDa para la CaM bovina y

16.7 kDa para la CaM de *Giardia*. La estructura primaria de la cadena polipeptídica contiene la lisina 115 trimetilada. El papel de esta proteína en la enquistación y desenquistación o en otras funciones del parásito no ha sido dilucidada aunque se ha sugerido su participación en la regulación de la ATPasa dependiente de calcio y su transporte a través de la membrana (Muñoz y cols, 1988).

Entamoeba histolytica. La amiba patógena del hombre, *Entamoeba histolytica* requiere de una actividad lítica para invadir la mucosa intestinal y producir úlceras. Los trofozoitos al contacto con colagena tipo I, inducen la formación y secreción de gránulos electrodensos (GED), los cuales contienen actividad colagenolítica, la cual se ha propuesto puede degradar la matriz extracelular. Poco se conoce sobre los mecanismos de secreción de los GED, pero los autores que han trabajado sobre la caracterización de ellos, proponen que la CaM participa en la secreción de éstos granulos. En los trofozoitos de *E. histolytica* la presencia de CaM con un PM aparente de 19.0 kDa, se demostró por ELISA, inmunofluorescencia y actividad de la fosfodiesterasa del AMPc. La participación de la CaM en la secreción de los GED se demostró por la inhibición de este proceso por los antagonistas específicos de CaM, TFP (IC_{50} 2.5 μ M), calmidazolium (IC_{50} 2.5 μ M) N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftalenolsulfonamida (W-7) (IC_{50} 100 μ M) y propanolol (IC_{50} 400 μ M) (Muñoz y cols, 1991). Otros estudios de este mismo grupo de trabajo enfocados a la localización de CaM en los

trofozoitos de *E. histolytica*, muestran mediante microscopía electrónica de transmisión, que la proteína se distribuye en el citoplasma y la redistribución de ésta, se modifica después de la inducción de la secreción de los GED por colágena tipo I y de Ca^{2+} (Muñoz y cols, 1992).

Schistosoma mansoni. En el trematodo *Schistosoma* han sido caracterizadas tres proteínas que unen Ca^{2+} , la primera aislada del tegumento de machos adultos en *S. mansoni* y purificada por cromatografía de interacción hidrofóbica, la mayor banda eluida tiene un PM aparente de 19 kDa y resulta positiva en ensayos de inmunoelectrotransferencia, con anticuerpos anti-CaM bovina (Thompson y cols, 1986). Posteriormente otras dos proteínas que unen Ca^{2+} han sido extraídas de otros estadios, y consideradas estadio/específico (Ram y cols, 1989; Moser y cols, 1992; Fuhrman, 1990). En adultos, machos y hembras, de *Schistosoma* se identificó una proteína que une Ca^{2+} , localizada en el músculo, denominada Sm20, la cual contiene, por lo menos, tres sitios de unión a Ca^{2+} en donde posiblemente sólo el dominio IV sea funcional. El análisis a partir de cDNA confirma que esta proteína pertenece a la familia "EF Hands", que es un polipéptido de 154 aa, con homología del 38.5% a otras calmodulinas. La lisina de la posición 115 no se encuentra trimetilada y el peso molecular aparente es de 17 kDa, el cual es más bajo que el PM reportado para Sm20. Por lo tanto estas características permiten proponer que la proteína Sm20 es más parecida a las proteínas sarcoplásmicas

solubles citosólicas que unen calcio que funcionan como reservorio en el músculo; propiedad muy similar a la que se presenta en otros invertebrados como crustáceos, moluscos y anélidos (Harvercroft y cols, 1990). Ensayos realizados a partir de la preparación de un antígeno somático con PM de 20 kDa, extraído de *S. mansoni* y *S. haematobium*, muestra una reacción cruzada con la proteína Sm20 y con extractos proteicos de otros tremátodos como *Fasciola hepatica* y *Paragonimus mexicanus* (Stewart y cols, 1992).

Recientemente Siddiqui aisló del tegumento del adulto de *Schistosoma mansoni*, varias proteínas que unen Ca^{2+} , con PM entre 15 y 205 kDa, de las cuales dos son compatibles con CaM (Siddiqui y cols, 1991).

ANTAGONISTAS DE CALMODULINA

Existen reportes de varios laboratorios que demuestran la existencia de un gran número de compuestos capaces de inhibir las funciones de la calmodulina. Se ha sugerido que la unión de estos antagonistas a la CaM puede ser de varios tipos:

1.- Interacción hidrofóbica entre la porción no polar de la CaM y la región lipofílica del fármaco.

2.- Interacción electrostática, entre los grupos amino de la droga, cargados positivamente y los residuos en la proteína (CaM) con carga negativa.

3.- Afinidad entre la CaM ácida (pH 5.0) y la droga básica (pH 8.0) (Hidaka y Kobayashi, 1992).

Para la actividad inhibidora óptima, la droga debe tener los grupos amino e hidrofóbicos separados por lo menos por tres átomos de carbono. El grupo de antagonistas más estudiado es el de las fenotiazinas; el hidroclohidrato de trifluoperazina (TFP) antipsicótico cuya presencia bloquea toda acción sobre las enzimas que requieren del complejo Ca^{2+} -CaM para su activación, la unión de TFP es reversible. La concentración de 5 μM inhibe a la CaM y concentraciones mayores a 25 μM son tóxicas para las células (Garofalo y cols, 1983; Roufogalis, 1985; Moreno, 1990).

Además de las fenotiazinas, las naftalenesulfonamidas (relajantes del músculo liso), como N-(-6-aminohexil-)-5-cloro-1-naftalenesulfonamida (W-7), que se une a la CaM con alta afinidad e interfiere con su acción, al inhibir las actividades enzimáticas dependientes de CaM. Estos compuestos son menos tóxicos y por lo tanto más utilizados cuando se trabaja con células y tejidos vivos, tienen la propiedad de penetrar la membrana celular y unirse a los complejos Ca^{2+} /CaM mediante interacciones de tipo hidrofóbico. Estos compuestos tienen la ventaja de contar con W-5, N-(-6-aminohil-)-1-naftalenesulfonamida con una estructura muy similar a W-7, la diferencia radica únicamente en una molécula de cloro, que le da una afinidad muy baja con CaM. Debido a esto, W-5, se puede emplear como un control de W-7.

La concentración inhibitoria para W-7 es de 25 a 100 μM y una concentración mayor a 150 μM es insoluble, además de

resultar tóxico; W-5 no tiene ningún efecto incluso a concentraciones mayores de 100 μM .

El efecto de los antagonistas sobre la CaM se ha determinado y cuantificado *in vitro*, mediante la activación de la fosfodiesterasa del AMPc después de la administración de los antagonistas de CaM. Estos compuestos al inhibir los complejos de Ca^{2+} -CaM, inhiben la activación de diferentes enzimas dependientes de CaM (Moreno, 1990, Muñoz y cols, 1991).

Se sabe que los antagonistas de CaM también pueden inhibir a la proteína cinasa C (PKC), dependiente de Ca^{2+} /diacilglicerol cuya función como mensajero intracelular en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos es independiente de CaM. La inhibición de la proteína cinasa C (PKC) es dependiente de las concentraciones de los antagonistas de CaM que se emplean, es decir, altas concentraciones pueden inhibir a la PKC de manera competitiva con fosfolípidos. Debido a esto último es necesario emplear inhibidores específicos de la PKC como controles y de esa forma descartar aquellos efectos inespecíficos atribuibles a los antagonistas de CaM (Kawamoto y Hidaka, 1984; Wright y Hoffman, 1987). Para éstos propósitos se emplea a la isoquinoleina sulfonamida (H-7) que es un compuesto que inhibe la fosforilación mediada por PKC, pero no la mediada por el complejo Ca^{2+} -CaM (Birrel, 1989). Su mecanismo de acción es directo sobre el sitio catalítico de la cinasa, que corresponde al sitio de unión del ATP (Kuo-Ping Huang, 1989).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe un importante número de protozoarios y helmintos que completan alguna etapa de su ciclo biológico como parásitos del hombre. La transformación de la fase infectante en la fase patógena involucra una reestructuración tanto de la forma del parásito como cambios en la expresión genética para sintetizar las proteínas funcionales que permitan el éxito en la colonización, invasión y multiplicación dentro del individuo hospedero. Esto puede lograrse gracias a que el parásito posee sistemas sensibles a las condiciones ambientales que disparan la ejecución de funciones latentes en él, así como la expresión de los genes específicos requeridos para la diferenciación de los mecanismos de adhesión, invasión, multiplicación y evasión dentro del huésped. La identificación de las señales reguladoras del funcionamiento del parásito, los sistemas de transmisión de señales a través de la pared y/o membrana, así como los segundos mensajeros involucrados, permitirá desarrollar mejores estrategias para combatir la infección/enfermedad.

La inhibición de la invasión de merozoitos de *P. falciparum* a los eritrocitos y de epimastigotes de *L. donovani* a hepatocitos, así como el bloqueo de la liberación de los gránulos electrodensos de trofozoitos de *E. histolytica* con actividad colagenolítica, por compuestos capaces de antagonizar las funciones dependientes de calcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM) y de proteínas activadas por el complejo Ca^{2+} -CaM, plantea la necesidad de estudiar el papel de la calmodulina (CaM) en los mecanismos del ciclo de vida de los protozoarios parásitos del hombre.

Giardia lamblia presenta en su ciclo biológico una fase de resistencia e infectante, el quiste y una fase parásita y patógena, el trofozoito, que se alternan entre el hospedero y el medio ambiente. Es el quiste la fase infectante que se pone en contacto con el huésped e inicia la infección, dentro del hospedero el quiste se transforma en trofozoito y coloniza el duodeno e inicio del yeyuno. El desenquistamiento de *G. lamblia* es un proceso inducido y la pared del quiste requiere de estímulos externos, como pH ácido y temperatura de 37°C para desencadenar una serie de eventos que culminan con la eclosión de dos trofozoitos por cada quiste (Bingham y Meyer, 1979; Gillin y Diamond, 1981b).

Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares que intervienen durante el desenquistamiento.

Varios estímulos externos podrían actuar sobre la pared del quiste de *G. lamblia* y facilitar la entrada de Ca^{2+} o movilizar el calcio intracelular, que al unirse a proteínas de la familia EF Hands, como calmodulina, podrían desencadenar el proceso de desenquistamiento, apoyado en un gran número de observaciones que demuestran que el complejo Ca^{2+} -CaM puede participar en la transmisión de señales que regulan el funcionamiento de diversos procesos biológicos. El propósito de este trabajo es definir la localización de CaM, así como actividades enzimáticas estimuladas por Ca^{2+} -CaM durante el desenquistamiento de *G. lamblia* asimismo determinar si este proceso es bloqueado por compuestos anti-CaM.

H I P O T E S I S

Si la calmodulina (CaM) participa activamente durante la desenquistación de *Giardia lamblia*, entonces podrán detectarse cambios y redistribución de CaM, así como la presencia de proteínas dependientes de Ca^{2+} -CaM, y el empleo de antagonistas de CaM bloquearán este proceso biológico.

O B J E T I V O G E N E R A L

Determinar la participación de la CaM en la regulación del desenquistamiento del protozoario intestinal *Giardia lamblia* como parte de su ciclo biológico.

O B J E T I V O S E S P E C I F I C O S

- 1.- Cuantificar CaM durante el desenquistamiento de *G.lamblia*.
- 2.- Evaluar si se detectan cambios en la localización de CaM durante el desenquistamiento de *G. lamblia*.
- 3.- Determinar si el tratamiento de los quistes completos (QC) de *G. lamblia* con antagonistas de CaM, modifica el desenquistamiento.
- 4.- Determinar si se modifica la eclosión de los trofozoitos de *G. lamblia* cuando los quistes inducidos (QI) son colocados en el medio de cultivo suplementado con antagonistas de CaM.
- 5.- Identificar si existe fosforilación de proteínas dependiente de Ca^{2+} -CaM, durante el proceso de desenquistamiento de *G. lamblia*.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

QUISTES DE *Giardia lamblia*

Los quistes de *G. lamblia* fueron obtenidos de muestras de heces de niños cuyos resultados de exámenes coproparasitológicos (CPS), indicaron su presencia. Se procesaron sólo aquellas heces que albergaban a *G. lamblia* como único parásito y que por observación con microscópica de luz contenían más de 1,000 quistes/campo. Las muestras de heces se conservaron en refrigeración hasta su uso. Todas las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de parasitología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

CONCENTRACION, PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE QUISTES

Para la obtención de quistes purificados y viables de ser utilizados en diversos ensayos se homogeneizaron porciones de 4.0 g de heces con 45 ml de Triton X-100 al 0.2%, tamizados con una malla de alambre y gasa a un tubo de 50 ml y después se centrifugó a 700 Xg durante cinco minutos. Este procedimiento se repitió dos veces, para desechar la mayor cantidad de detritus y quedar finalmente con un sedimento que contenía los quistes.

Para concentrar los quistes se utilizó la técnica de gradiente simple de sacarosa 0.85 M (densidad 1.1) a 4°C y centrifugación a 600 Xg durante 10 minutos, ésto permitió

obtener en la interfase los paquetes de quistes (Bingham y Meyer, 1979).

Después de la separación con sacarosa, los quistes se lavaron con solución salina isotónica para realizar un segundo gradiente discontinuo con percoll (30%, 40% y 50%), centrifugación a 600 Xg a 4°C durante 15 minutos, y finalmente recuperar los quistes en la interfase de 40% (Avron y cols, 1983).

Para eliminar la contaminación de enterobacterias y levaduras, antes y después de las concentraciones con los diferentes gradientes, y después del tratamiento con la solución inductora, los quistes se lavaron con una solución salina isotónica con antibiótico (SSA) (penicilina 1 millón de unidades, estreptomycinina 1 gramo, gentamicina 100 mg y anfotericina B 50 mg, en un litro de solución salina isotónica 145.3 mM). Después de realizar este procedimiento se verificó la ausencia de desarrollo bacteriano y micótico con siembras en medio de cultivo para Gram (+) y (-), agar sangre, agar eosina-azul de metileno (EMB), McConkey y para hongos el medio de Sabauroud (Bernal, 1990).

Los quistes obtenidos se cuantificaron con el empleo de una cámara de Neubauer, para manejar cantidades conocidas en los diferentes ensayos (Henry, 1990). De esa manera se determinó el número de quistes por mililitro de suspensión en SSA y se identificaron como quistes completos (QC).

PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LOS QUISTES

A partir de los paquetes de quistes completos, se tomaron 20 µl de suspensión con 20,000 quistes de *G. lamblia* y fueron depositados en un porta-objeto, se le agregó 20 µl de solución acuosa de eosina Y al 1% y se colocó un cubre-objeto. Bajo observación microscópica con seco fuerte (40x) se realizó una cuenta diferencial en 100 quistes, entre los que permanecían sin colorear (viables) y los que se teñían de rojo (no viables). La cuenta diferencial se realizó cinco veces y se obtuvo el promedio (Bingham y cols, 1979).

INDUCCION "in vitro" DE DESENQUISTACION

Los QC viables (verificados por exclusión de eosina) en un volumen de 1.0 ml, se colocaron en una suspensión 1:10, con 9.0 ml de solución inductora de HCl 0.1N a pH 1.6 (preparada con agua inyectable PISA). La suspensión fue incubada a 37°C, durante 40 minutos, en agitación lenta. Después de la incubación los quistes recibieron de dos a tres lavados con SSA (600 Xg/ 2 min) y fueron identificados como quistes inducidos QI (Bernal, 1990).

ECLOSION DE LOS TROFOZOITOS

Todas los ensayos de eclosión de los trofozoitos se llevaron a cabo en el medio de cultivo BI-S-Bb (biosate (BBL)- 3.0 g, glucosa - 55.5 mM, cloruro de sodio - 3.41 mM, ac. ascórbico - 1.14 mM, L-cisteína- HCl- monohidratado -

1.65 mM, fosfato dibásico de potasio - 0.574 mM, fosfato monobásico de potasio - 0.440 mM y citrato férrico de amonio - 2.0 mM, en agua bidestilada, suplementado con bilis bovina - 0.1 g y suero bovino - 10 ml, por cada 100 ml, ajustado a pH 7.2 (con NaOH 1.0 N) y esterilizado por filtración con una membrana Milipore de 0.45 μm (Keister, 1983).

Para conservar el medio de cultivo hasta su uso, éste fue envasado en condiciones estériles en tubos de borosilicato con tapón de rosca y conservados en refrigeración no más de dos semanas.

Las condiciones de eclosión en medio de cultivo axénico fueron distintas según el propósito del experimento y se identificaron como quistes inducidos y colocados en medio de cultivo QIMC:

a) Para ensayos con los antagonistas de CaM y los inhibidores de proteína cinasa C se utilizaron 300,000 QI. En las placas de cultivo de 96 pozos, a las que previamente se les colocaron 200 μl de medio BI-S-Bb; se les agregó 3,000 QI/pozo y de inmediato se incubaron a 37°C. Las placas de cultivo se colocaron bajo el microscopio de luz invertida para observar la eclosión de los trofozoitos y determinar el porcentaje de desenquistación, a una hora y 24 horas de ser colocados los QI en el medio de cultivo.

b) Otro grupo de QI (en paquetes de 1×10^6 a 50×10^6) se depositaron en tubos (eppendorf) con 1.0 ml de medio BI-S-Bb y de inmediato se incubaron a 37°C durante una hora, estos quistes identificados como quistes inducidos e incubados en

medio de cultivo (QIMC). Los QIMC fueron utilizados en ensayos de inmunofluorescencia (IFI), electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunoelectrotransferencia (Western blot).

DETERMINACION DE PROTEINAS EN EXTRACTOS DE QUISTES

Con el propósito de determinar la concentración de proteínas en los extractos de quistes completos (QC), se les agregó inhibidores de proteasas, p-hidroximercuri-benzoato (pHMB) 20 mM y N-etil-maleamida en una concentración 10 mM. Posteriormente éstos se rompieron por sonicación, en una frecuencia de 18 micrones, con 15 pulsos de 30 seg c/u, con intervalos de 30 seg, en baño de hielo. La ruptura de los quistes se verificó con observaciones microscópicas. La cantidad de proteína en los extractos de quistes se determinó mediante la técnica de Lowry y cols (1951), en concentraciones de 5, 10, 20 y 25 μ l, se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La reacción colorida se cuantificó en espectrofotómetro con luz visible (VIS) a 750 nm.

CUANTIFICACION DE CaM MEDIANTE LA ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc

Para determinar la CaM en quistes completos y quistes inducidos se utilizaron inhibidores de proteasa para prevenir la degradación y determinación errónea de los niveles de CaM;

los quistes fueron solubilizados por sonicación y se cuantificó la cantidad de proteína. Se elaboró una recta de correlación, como referencia, a partir de una solución de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) en una cinética de 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 μmol .

Todo el material de cristalería utilizado en los ensayos de determinación de fosfato inorgánico y de activación de la fosfodiesterasa del AMPc, se lavó con detergente libre de fosfatos y se secó al horno.

La cantidad de CaM en los extractos proteícos de quistes completos e inducidos fue cuantificada con base en la determinación de la activación de la fosfodiesterasa del AMPc de corazón bovino. La solución de incubación (Tris, acetato de magnesio, CaCl_2 , 5'nucleotidasa, fosfodiesterasa, en agua desionizada) fue agregada a 30°C en agitación durante 30', como sustrato AMPc 20 mM de acuerdo a la técnica de Teo y Wang, 1973. La reacción se paró con ácido tricloroacético (TCA) al 50% a temperatura ambiente, más molibdato de amonio al 2.5%. Se reveló con solución de Eicógeno 1,2,4 ácido amino oftaleno sulfónico (ANS) en incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. El ortofosfato inorgánico (Pi) se midió en el sobrenadante después de ser liberado por la hidrólisis del 5' AMP, realizado por la 5'nucleotidasa, según el método colorimétrico de Flynn y cols, la lectura de absorbancia fue con luz visible (VIS) a 660 nm (Flynn y cols, 1954).

A la densidad óptica leída en el espectrofotómetro a 660 nm, se le calculó la concentración de Pi, de acuerdo a la

recta de correlación de fosfato inorgánico ($r=0.99$). La actividad de fosfodiesterasa se graficó en nmoles/minuto contra microgramos (μg) del extracto de proteína de quistes. La lectura en extractos de trofozoitos de *G. lamblia* y calmodulina bovina se utilizó como control. Una unidad de calmodulina (UCaM/mgP) es el valor obtenido cuando se logra el 50% de activación de la fosfodiesterasa (Sharma y cols, 1988).

ANTICUERPOS POLICLONALES DE BORREGO ANTI-QUISTE DE *G. lamblia*

Con la finalidad de preparar los anticuerpos contra quistes se elaboró un esquema de inmunización a borrego. Primero se obtuvieron 20 ml de sangre total del borrego, para separar un suero preinmune. De acuerdo al esquema de inmunización se inoculó por vía intramuscular 1.0 mg de proteína de quistes en 1.0 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS) a pH 7.2, mezclada con 1.0 ml de adyuvante completo de Freund. La inmunización se repitió en cuatro ocasiones, cada ocho días, más adyuvante incompleto de Freund. Diez días después de la última inyección se sangraron 100 ml del animal para determinar anticuerpos. Tres semanas después el borrego recibió un segundo esquema de inmunización, con inoculaciones de 2.0 mg de proteína en 1.0 ml de amortiguador, en cuatro ocasiones más, cada ocho días. Finalmente se sangraron 100 ml del borrego (Harlow y Lane, 1988).

EXTRACCION DE CaM BOVINA

Para la obtención de CaM bovina utilizada para inmunizar un conejo fue necesario realizar varias extracciones a partir de testículos bovinos. Se lavaron, cortaron en pedazos y se homogeneizaron 300 gramos de testículos bovinos con amortiguador Tris-HCl más ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) a pH 7.4. Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Para precipitar las proteínas se calentó el sobrenante en baño María a ebullición por cinco minutos, (en esas condiciones la CaM es termoestable), el precipitado se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se dializó durante toda la noche a 4°C contra un amortiguador Tris-HCl a pH 7.4, en agitación constante. Para separar las proteínas se aplicó la muestra a una columna hidrofóbica de fenil-sepharosa equilibrada con amortiguador Tris-HCl de alta concentración y CaCl₂ a pH 7.4; después se lavó con amortiguador Tris-HCl de baja concentración y fue eluido con Tris-HCl y EDTA a pH 7.4. Se colectaron las fracciones de 1.5 ml y determinadas a 280 nm (Gopalakrishna y cols, 1982). A las fracciones de mayor densidad óptica, se les cuantificó la concentración de proteínas, con la técnica de Lowry y cols (1951) y las de alta concentración, se colocaron en electroforesis en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%, teñidos después con azul de Coomassie.

ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO ANTI-CaM

A partir de las extracciones de calmodulina de testículos bovinos, se inmunizó un conejo con 1.0 mg de proteína más adyuvante completo de Freund, en la primera ocasión y posteriormente tres inmunizaciones, 1.0, 1.4 y 1.95 mg sin adyuvante, cada diez días. Previo a la inmunización se realizó un sangrado de 10 ml, para obtener suero preinmune (Harlow y Lane, 1988). Diez días después de la última inmunización el conejo se sangró a blanco.

ANTICUERPOS POLICLONALES DE RATON ANTI-CaM

Se inmunizaron tres ratones Balb/c con calmodulina bovina comercial (Sigma) por via intra-plantar, con el siguiente esquema: Previa obtención de suero preinmune. La primera dosis de 50 µg de CaM, se emulsionó con 50 µl de adyuvante Titer Max, las siguientes tres inoculaciones en lapsos de ocho días, fueron de 50 µg sin adyuvante. En un segundo refuerzo, 10 días después por dos ocasiones, se le inocularon 100 µg de CaM con 100 µl de Titer Max, la primera vez y la segunda dosis sin adyuvante. Se sangraron totalmente diez días después.

PRECIPITACION DE GAMAGLOBULINAS DE BORREGO, CONEJO Y RATON

El suero hiperinmune de todos los animales inmunizados se separó por centrifugación, se le agregó amortiguador de boratos con pH 8.7, y las inmunoglobulinas se precipitaron

con sulfato de amonio saturado (SAS) al 50%. El precipitado se resuspendió en PBS a pH 7.2 y dializó contra PBS a pH 7.2 durante tres días a 4°C y agitación continua, en varios cambios. Las gamaglobulinas obtenidos se separaron en alícuotas y conservaron a -20°C (Dixon, 1953).

CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS POR EL ENSAYO INMUNOENZIMATICO INDIRECTO (ELISA)

Anticuerpos policlonales de borrego anti-quiste. El antígeno de *G.lamblia* que se empleo en la prueba de ELISA fue preparado de extracto sonificado de quistes y resuspendido en amortiguador de Tris- pHMB. Se recubrieron las placas de Immunol I con 10 µg de antígeno aforado a 50 µl con amortiguador de carbonatos a pH 9.6 e incubadas durante toda la noche a 4°C. Transcurrida la incubación las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.05%. Se bloquearon con PBS-BSA al 1% e incubaron a 37°C, durante una hora, o toda la noche a 4°C y lavadas nuevamente. Para titular el anticuerpo se realizaron diluciones seriadas de 1:50 a 1:3,200, con PBS-Tween 0.05%. Se agregó el conjugado anti-borrego/peroxidasa (Sigma) y se incubó a 37°C durante una hora. Después de lavado, se reveló con ortofenildiamina (OPD) (Sigma) como sustrato. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2.5 N y los valores de densidad óptica se determinaron en el espectrofotómetro a VIS 492 nm (Voller y Bidwell, 1986).

Anticuerpos policlonales de conejo y de ratón anti-CaM.

Los pozos de poliestireno de la placa Immunol I se recubrieron con 10 µg de CaM bovina comercial (Sigma)/pozo aforado a 50 µl de amortiguador de carbonatos, en una incubación de 4°C toda la noche. Transcurrida la incubación, los pozos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1.0% y posteriormente lavados. Los sueros de conejo y ratón se probaron de acuerdo con los siguientes esquemas:

A) En el caso del anticuerpo policlonal de conejo anti-CaM se usó en diluciones seriadas de 1:50 a 1:1,000 y se incubó a 37°C durante una hora. Después del lavado se agregó el conjugado anti-conejo/peroxidasa (Sigma), las placas se incubaron a 37°C una hora. Después del lavado la reacción se reveló con ortofenildiamina (OPD) como sustrato. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2.5 N y fue leído en el espectrofotómetro a VIS 492 nm.

B) El anticuerpo policlonal de ratón anti-CaM se usó en diluciones seriadas de 1:50 a 1:1,000, las placas se incubaron a 37°C por una hora. Después del lavado se agregó el conjugado anti-ratón/peroxidasa. El resto de la técnica fue similar al inciso (A).

DETECCION DE CaM POR EL ENSAYO INMUNOENZIMATICO INDIRECTO (ELISA) EN QC, QI y QIMC DE *G. lamblia*

Se llevó a cabo una ELISA indirecta para la detección de CaM en extractos proteicos de QC, QI y QIMC. Las cajas de poliestireno Immunol I fueron recubiertas con el extracto de

proteína en concentraciones de 50 µg/pozo, aforado a 50 µl en amortiguador de carbonatos, en una incubación a 4°C durante toda la noche. Se adicionó el primer anticuerpo policlonal de conejo anti-CaM 1:800 (obtenido en el laboratorio), enseguida se agregó el segundo anticuerpo, anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:64) (Sigma) y el resto de la técnica se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente. Como control se emplearon 25 µg de extracto de trofozoitos de *G. duodenalis* de la cepa Portland-1 (donado por la Dra. G. Ortega-Pierres) y 10 µg de CaM bovina comercial (Sigma).

Otro ensayo, en condiciones similares, fue con el empleo de un anticuerpo policlonal de conejo anti-CaM (donado por la Dra. G. Benítez-King).

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-QUISTE Y ANTI-CaM

Para los ensayos de IFI se prepararon diferentes lotes de QC, QI, QIMC y trofozoitos eclosionados en el laboratorio, además trofozoitos de *G. duodenalis* de la cepa Portland-1.

Los quistes con los diferentes tratamientos se lavaron con PBS pH 7.2 y fijaron durante 15 minutos con formaldehído al 1.85% y glutaldehído al 0.125% a 37°C. Se lavaron nuevamente con PBS y se neutralizaron con glicina 1.0 M durante 15 minutos a 37°C. Después los quistes se permeabilizaron con Triton X-100 al 1.0% y los trofozoitos al 0.5%, ambos teñidos con azul de Evans 0.0025% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se lavaron tres veces con

solución salina isotónica. Los quistes y los trofozoitos así tratados se distribuyeron en alícuotas de 250,000 cada una, por tubo eppendorf en solución salina isotónica.

Anticuerpos anti-quiste. Las alícuotas de QC, QI, QIMC y los trofozoitos fueron tratados con el primer anticuerpo policlonal de borrego anti-quiste 1:10 durante toda la noche a 4°C y lavados tres veces con PBS. En seguida se incubaron con el segundo anticuerpo de conejo anti-borrego conjugado con isotiocianato de fluoresceína 1:1,000 (Sigma) a 37°C durante una hora y lavados con PBS; finalmente se montaron en glicerol al 50%.

Anticuerpos anti-CaM. Los quistes tratados y los trofozoitos fueron incubados con el primer anticuerpo, el policlonal de conejo anti-CaM 1:10 durante toda la noche a 4°C y lavados tres veces con PBS. Inmediatamente se incubaron con el segundo anticuerpo, IgG de borrego anti-conejo conjugadas con isotiocianato de fluoresceína 1:1,000 (Sigma), a 37°C durante una hora y lavados con PBS. Finalmente se montaron en glicerol al 50%.

En otros ensayos con las mismas mismas muestras, se emplearon en iguales condiciones los primeros anticuerpos pero, para amplificar la señal de fluorescencia las muestras se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado a proteína A-biotina (1:200) (Sigma) y finalmente se trataron con un tercer anticuerpo acoplado a avidina-fluoresceína (1:100). Las laminillas se observaron a 100x en microscopía de luz fluorescente, con una longitud de onda de 495 nm.

TRATAMIENTO DE QC Y QI CON ANTAGONISTAS DE CaM E INHIBIDORES DE LA PROTEINA CINASA C (PKC)

Tratamiento de quistes completos (QC). Para llevar a cabo estos ensayos, primero se prepararon las diferentes concentraciones de los antagonistas de CaM, Trifluoperazina dehidroclorada (TFP) (Sigma) de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 50 y 100 μM , N-(-6-aminohexil-)-5-cloro -1-naftalenolsulfonamida (W-7) (Sigma) y N-(-6-aminohexil-)-1-naftalenosulfonamida (W-5) (Sigma) de 10, 15, 20, 50 y 100 μM , y también el compuesto (1-5-isoquinolne sulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) inhibidor de proteína cinasa C (PKC), de 10, 20, 50 y 100 nM. Todos los antagonistas e inhibidores se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 2%.

En estos ensayos se incubaron 20,000 quistes completos purificados, en tubos eppendorf con las distintas concentraciones de antagonistas de CaM e inhibidor de proteína cinasa C (PKC), preparados en DMSO al 2%, de 16 a 18 horas a 4°C. Después de la incubación se retiró el sobrenadante, mediante centrifugación y los quistes se lavaron con solución salina con antibiótico. De inmediato los quistes se colocaron en la solución inductora, e incubaron a 37°C por 40 minutos, después de la incubación se lavaron nuevamente con SSA. En placas de cultivo de 96 pozos, se colocaron alícuotas con 3,000 quistes inducidos y 200 μl de medio de cultivo (Keister, 1983)/pozo. Asimismo, se

utilizaron quistes sin tratamiento con antagonistas, sólo en solución salina con antibiótico y quistes colocados en el solvente DMSO al 2%. Todas las placas de pozos se incubaron a 37°C durante 24 horas. En todos los casos el ensayo se realizó por cuadruplicado y se determinó viabilidad.

Tratamiento a quistes inducidos (QI).

En este tipo de ensayo se colocaron 200 µl de medio de cultivo en las placas de 96 pozos y se les añadieron los antagonistas de CaM, TFP, W-7, W-5, y el inhibidor de proteína cinasa C, H-7, a las mismas concentraciones que el ensayo anterior. Posteriormente fueron agregados 3,000 quistes inducidos/pozo e incubados a 37°C por 24 horas. En todos los casos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

CUANTIFICACION DEL PORCENTAJE DE DESENQUISTACION Y VIABILIDAD

Para determinar el efecto de los compuestos se cuantificó el porcentaje de desenquistación, es decir, el número de trofozoitos que eclosionan contra el número de quistes inducidos que permanecen íntegros, después de una y 24 horas de incubación en el medio de cultivo. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron al microscopio de luz invertida. En cada una de las concentraciones de antagonistas, inhibidor y controles se realizó un promedio de cinco lecturas, en una cuenta diferencial de 100 células, todo por cuatriplicado.

$$\frac{T}{T + QC} \times 100 = \% \text{ Desenquistación}$$

T + QC (Schaefer y cols, 1984)

QC= quistes completos
T= trofozoitos

Después de cuantificar el porcentaje de desenquistación a las 24 horas, se tomaron 20 μ l de medio de cultivo con los quistes, entre porta y cubre-objeto y se les agregó 20 μ l de eosina-Y al 1%, para cuantificar el porcentaje de viabilidad. Se realizó el promedio de cinco lecturas de cada concentración de antagonista de CaM, inhibidor de PKC y controles, en una cuenta diferencial de 100 células. Los quistes no teñidos corresponden a los viables y los quistes teñidos a los no viables. Esto se realizó en todos los ensayos por cuadruplicado. Los resultados se reportan en porcentaje de viabilidad (Bingham y cols, 1979).

INUMOFLUORESCENCIA INDIRECTA CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-CaM EN QUISTES TRATADOS CON COMPUESTOS ANTI-CaM (TFP,W-7,W-5) Y ANTI-PKC (H-7), ANTES Y DESPUES DE LA INDUCCION DEL DESENQUISTAMIENTO

Para observar la localización de CaM en quistes tratados con compuestos anti-CaM, la cantidad de 30,000 quistes completos fueron incubados con tres concentraciones de los

antagonistas de CaM, TFP (2.5, 5.0 y 10.0 μM), W-5 y W-7 (10, 20 y 25 μM) y el inhibidor de PKC, (10, 20 y 50 nM), a 4°C, de 16 a 18 horas. Después de retirado el sobrenadante y lavados con solución salina más antibiótico (SSA) se separaron tres alícuotas con 10,000 quistes cada una:

1) quistes completos (QC), 2) quistes colocados en solución inductora (QI) y 3) quistes colocados en solución inductora y después en medio de cultivo (QIMC). Después de efectuada la incubación, los quistes se lavaron nuevamente con SSA y se fijaron durante 15 minutos con formaldehído 1.85% y glutaldehído 0.125% a 37°C. A continuación se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos de conejo anti-CaM.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE-SDS) DE EXTRACTOS DE QC, QI y QIMC.

Los extractos proteicos de QC, QI y QIMC se depositaron en 60 μl de amortiguador de muestra (glicerol/SDS) sin beta mercaptoetanol y se rompieron por ebullición durante 5 min; después se les agregó beta mercaptoetanol a una concentración final del 5% y se colocaron en ebullición por otros 5 min. Se prepararon los geles de poliacrilamida al 7.5%, 10% y 12% (agua bidestilada, Tris-HCl pH 6.8 y 8.8, bis/acrilamida, SDS, Temed y persulfato de amonio) (Laemmli, 1970).

Del extracto de quistes sonicados, se tomaron 20 μl que contenían 20 μg de proteína; se les agregó 5 μl de amortiguador de muestra y se pusieron en ebullición durante 5

min. Se colocaron en el gel los marcadores de peso molecular (97.4 kDa fosforilasa de músculo de conejo, 66.2 kDa albúmina sérica bovina, 45.0 kDa ovoalbumina de pollo, 31.0 kDa anhidrasa carbónica bovina, 21.0 kDa inhibidor de tripsina de soya y 14.4 kDa lisozima de pollo). En el resto de los carriles se depositaron las muestras; la corrida electroforética se realizó a 100 volts durante 90 minutos, después se tiñó con azul de Coomassie y/o nitrato de plata (Oakley y cols, 1980).

ELECTROTRANSFERENCIA

Transcurrido el tiempo de corrimiento electroforético, el gel fue retirado de la cámara de electroforesis y sumergido en amortiguador de transferencia (Tris/glicina/metanol) a pH 8.3 para equilibrar. La transferencia se realizó en algunas ocasiones en la cámara de condiciones húmedas y otras en condiciones semi-secas, sobre papel de nitrocelulosa. La transferencia de proteínas se realizó a 4°C en una cámara fría a 150 volts, durante 90 minutos.

Después de realizar la transferencia se verificó con rojo Ponceu el paso de las proteínas al papel de nitrocelulosa; posteriormente la membrana fue bloqueada con PBS-tween 20 a 0.05% y leche descremada al 5.0%, a temperatura de 4°C, durante una hora, (modificación de Towbin y cols, 1979).

INMUNODETECCION DE CaM EN QC Y QI POR ELECTROTRANSFERENCIA EN PAPEL PVDF

Se realizaron varios ensayos de IET en las condiciones ya descritas, con la membrana de nitrocelulosa y el amortiguador de inmunotransferencia Tris-glicina-metanol, sin lograr la transferencia de CaM.

Por la dificultad de electrotransferencia de CaM se procedió mediante la técnica descrita por Hulen y cols; en condiciones ya descritas se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%. Posteriormente las proteínas se electrotransfirieron en condiciones húmedas con amortiguador de transferencia de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) a pH 7.0 a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF). Después de la transferencia se fijó la membrana con glutaldehído 0.2% preparado en amortiguador de fosfatos, durante 45 min a temperatura ambiente y bloqueada con TBS-tween 20 a temperatura ambiente (Hulen y cols, 1991). Para la inmunodetección se realizaron ensayos con dos variantes: Uno en donde se empleó un primer anticuerpo anti-CaM de conejo en dilución 1:800 de acuerdo a la titulación del laboratorio y otro con el empleo de un primer anticuerpo anti-CaM de ratón en dilución 1:800 de acuerdo a la titulación del laboratorio, en las dos variantes los anticuerpos se incubaron por una hora a 37°C y la membrana se lavó vigorosamente por tres veces, con solución TBS-tween 20 a 0.05%. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-conejo y un anti-ratón, ambos acoplados a peroxidasa 1:2,000 (Sigma) durante una hora a

37°C y se lavon en la misma forma. Finalmente la inmunodetección se realizó mediante luminol revelada sobre una placa de rayos X durante uno o dos minutos.

Un tercer variante en otro ensayo de inmunodetección fue el empleo de un primer anticuerpo de conejo anti-CaM 1:800, como segundo anticuerpo un anti-conejo biotinilado 1:2,000 y al final se agregó streptoavidina-fosfatasa 1:2,000 y se reveló con nitra azul de tetrazolio- 5-bromo-4-cloro-3-indilil fosfato (NBT-BCIP).

IDENTIFICACION DE FOSFOPROTEINAS EN DIFERENTES TIEMPOS DE INDUCCION DE DESENQUISITAMIENTO

Con el propósito de identificar proteínas fosforiladas durante el proceso de desenquistamiento se realizaron varios tipos de ensayos.

A 250 millones de quistes purificados, colocados en 1.0 ml de medio Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) sin fosfato, con una mezcla de inhibidores de fosfatasas, molibdato de sodio 20 mM, ortovanadato de sodio 20 μ M y fluoruro de sodio 50 mM, les fue incorporado 0.4 mCi de ortofosfato [³²P] (en condiciones especiales de manejo de radioactividad), en una incubación a temperatura ambiente de 16 horas, con agitación continua. Al término de la incubación se retiró la marca radioactiva con tres lavados de PBS. Los quistes, divididos en cinco alícuotas de 50 millones, se sometieron a la acción de la solución inductora de desenquistamiento, en periodos de

10, 20, 30, 40 y 60 minutos, a 37°C. Finalmente se lavaron una vez más con PBS, para quitar el exceso de ácido. A la pastilla, después de la centrifugación, se le agregaron 60 µl de amortiguador de muestra sin beta (β) mercaptoetanol, se sometió a ebullición durante 5 minutos, se les agregó β mercaptoetanol a concentración final de 5% y nuevamente se calentó a ebullición por otros 5 minutos. Se realizó un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 10%, teñido con nitrato de plata. El gel se colocó sobre papel filtro en un secador de geles durante 20 minutos. Posteriormente fue expuesto a autorradiografía por cuatro días, a -70°C. La placa se reveló (Rudolph y Krueger, 1979).

AUTORRADIOGRAFIA

En todos los casos el gel seco, fue colocado en un cassette y expuesto sobre una placa de rayos X a menos -70°C. El tiempo empleado de exposición varió de acuerdo al experimento. Así mismo todas las placas se revelaron en el cuarto oscuro, en solución reveladora (Kodak) al 25% de 2 a 3 minutos y con fijador (Kodak) al 25% de 2 a 3 minutos y finalmente se lavaron con agua corriente.

DETECCION DE FOSFOPROTEINAS DE QC, QI y QIMC.

A 200 millones de QC, se les incorporó la marca radioactiva de ortofosfato [^{32}P] (0.4 mCi), después de la incorporación se dividieron en tres grupos: QC, QI y QIMC. Se rompieron los quistes en las condiciones ya descritas y se

realizó un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 7.5%. Después de secar el gel éste se expuso por autorradiografía durante 50 horas y se reveló la placa para su observación.

DETECCION DE FOSFOPROTEINAS DE QUISTES PERMEABILIZADOS CON TRITON X-100.

A cuatro paquetes de quistes, de 50 millones cada uno, preparados en concentraciones de Triton X-100 de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5%, se les incorporó por separado 0.1 mCi de [³²P]. Las diferentes alícuotas se incubaron en solución inductora de desenquistamiento, a 37°C, durante 40 minutos y tratados en las mismas condiciones con el amortiguador de muestra. Los extractos se separaron en dos alícuotas: Una fue colocada en gel de poliacrilamida al 10% para electroforesis, teñidos con Coomasie, desteñidos y secados. Otra, para facilitar la resolución de los polipéptidos de alto peso molecular se colocó en gel de poliacrilamida al 7.5% para electroforesis, también fueron teñidos, desteñidos y secados. La autorradiografía de ambos geles se realizó a -70°C durante de 50 horas.

DETECCION DE FOSFOPROTEINAS DE QUISTES TRATADOS CON AMORTIGUADOR RIPA

El amortiguador de RIPA es empleado para facilitar el rompimiento de células, su preparación es: Tris-HCl pH 7.4 SDS, desoxicolato de sodio. A 100 millones de quistes se les

manejó en condiciones similares de incorporación de ortofosfato. Después del lavado se formaron dos grupos de 50 millones cada uno:

Quistes completos más RIPA (QC+RIPA)

Quistes inducidos más RIPA (QI+RIPA)

La solución de RIPA en todos los casos se agregó en un volumen de 50 μ l/50 millones de quistes, más inhibidores de fosfatasa y se incubaron a 4°C, durante una hora, en agitación continua. Posteriormente los quistes se rompieron en condiciones similares a lo ya descrito y se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5%.

INMUNODETECCION DE FOSFOTIROSINA EN QC y QI

A una muestra que contenía 200 millones de quistes les fue incorporado el ortofosfato [³²P], se dividieron en dos lotes uno para QC y otro tratado con solución inductora de desenquistamiento (QI). Los quistes se rompieron en condiciones ya descritas, los extractos se colocaron en un gel de poliacrilamida al 10.0% para electroforesis y posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a papel de nitrocelulosa en condiciones húmedas con amortiguador de transferencia Tris-glicina (Towbin, 1979).

Después de realizar la transferencia se verificó el paso de proteínas al papel de nitrocelulosa con rojo Ponceu. La membrana fue bloqueada con PBS-tween 20 0.1%/leche al 5%, a temperatura ambiente. El primer anticuerpo fue anti-tirosina de conejo en dilución 1:200, e incubados durante una hora a

37°C. Se lavó vigorosamente con solución PBS-tween 20 0.1%, tres veces. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-conejo biotinilado diluido 1:2,000, durante una hora a 37°C. Lavado en la misma forma. Finalmente se agregó estreptoavidina-fosfatasa 1:2,000, por una hora a 37°C y fue revelado con nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT-BCIP).

DETECCION DE FOSFOPROTEINAS DE QUISTES TRATADOS CON ACETATO DE TETRA DECONOIL FORBOL (TPA).

La variable que tuvo este experimento fue que los quistes después de la incorporación de ortofosfato y la inducción de desenquistamiento, se trataron con el activador de la proteína cinasa C tetradeconoil forbol (TPA) a 0.5 μ M. El tratamiento de ruptura de quistes. El corrimiento electroforético y la autorradiografía fueron similares a lo descrito.

TITULACION POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE ANTICUERPO POLICLONAL DE CONEJO ANTI-MPK-II Y ANTI-CaM

Con el propósito de determinar el título de anticuerpo policlonal anti MPK-II y anti-CaM se empleó una muestra de 200 μ l que contenía 450 μ g de extracto de trofozoitos se separó en un gel preparativo de poliacrilamida al 10%. Posteriormente las proteínas separadas se electrotransfirieron en condiciones húmedas o semi-secas a

papel de nitrocelulosa. El anticuerpo policlonal fue preparado en diluciones seriadas de 1:50 a 1:6,400 con PBS-tween 20 a 0.1% con BSA al 5%, en un volumen final de 400 μ l.

La membrana transferida fue colocada en la cámara de titulación (Mini-screening) y se llenó cada carril de la cámara con 400 μ l de cada dilución del anticuerpo policlonal e incubada a 37°C durante una hora. Transcurrido el tiempo se retiró la membrana de la cámara y se lavó vigorosamente tres veces, con solución TBS-tween 20 a 0.05%. La membrana se cubrió con el segundo anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa en incubación a 37°C durante una hora. Fue lavada en iguales condiciones. La inmunodetección se realizó al cubrir la membrana con luminol y colocarla sobre una placa de rayos X durante uno o dos minutos, se reveló y fijó con Kodak.

IDENTIFICACION DE CALMODULINA Y PROTEINA-CINASA II (SLOT-BLOT)

A partir de una muestra de extracto de quistes, se colocaron 10 μ l, que contenían 10 μ g de proteína, sobre la membrana de nitrocelulosa en la cámara de slot-blot. Se colocaron también calmodulina comercial (Sigma), proteína-cinasa II y la albúmina sérica bovina (BSA), todos en igual concentración (10 μ g/10 μ l). Como primer anticuerpo, se utilizó uno de conejo anti-proteína cinasa II o de conejo anti-CaM, en dilución 1:10 y fue incubado a 4°C toda la noche, después de lavar por tres veces, se agregó el segundo

anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa 1:2,000 y se incubó a 37°C durante una hora y media. La membrana se lavó vigorosamente y se cubrió con luminol por un minuto, de inmediato fue expuesta en autorradiografía durante uno y dos minutos y después revelado.

INMUNODETECCION DE PROTEINA CINASA II EN QC Y QI

Las proteínas de quistes completos (QC), quistes con inducción de desenquistamiento (QI) y quistes con inducción de desenquistamiento y colocados en medio de cultivo (QCMC), se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, con 20 µl de extracto. Las proteínas fueron electrotransferidas en condiciones semi-secas a papel de nitrocelulosa con amortiguador Tris-glicina. Después de bloquear la membrana, le fue agregado el primer anticuerpo, anti-proteína cinasa II (PKII) de conejo (donado por la Dra. G. Benítez) a un título de 1:800 previamente determinado en el laboratorio, a 37°C durante una hora. Se lavó vigorosamente con solución TBS-tween 20 a 0.05% y se incubó con el segundo anticuerpo, anti-conejo acoplado a peroxidasa 1:2,000 a 37°C por una hora. La inmunodetección se realizó con luminol y fue revelada por autorradiografía durante uno o dos minutos.

R E S U L T A D O S

QUISTES DE *Giardia lamblia*

En promedio se aislaron de 1 a 5 millones de quistes por gramo de heces y la cuenta total de quistes, se manejó por mililitro de solución salina con antibiótico (SSA).

La determinación de proteínas en el sobrenadante del extracto de quistes completos, después de la sonicación, mostró que contenía una concentración de proteína que fluctuó entre 29.5 µg a 56.2 µg, con un promedio de 42.78 µg de proteína por millón de quistes.

RECONOCIMIENTO DE COMPONENTES DE QC, QI Y QIMC CON UN ANTICUERPO ANTI-QUISTE

A partir de los extractos de QC, QI y QIMC, el corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 10% y la tinción con Coomasie reveló en el carril 1 de QC, polipéptidos con peso molecular aparente que varió de 10, 30, 45 y 60 kDa. En el carril 2 de QI se observaron seis proteínas de 10, 18, 30, 45, 60 y 95 kDa. En el carril 3 de QIMC, se distinguen seis proteínas de 10, 18, 30, 50, 60 y 95kDa. En todos los casos se observó un polipéptido dominante compartido en los tres carriles de un PM aparente de 30 kDa (Fig. 1-A).

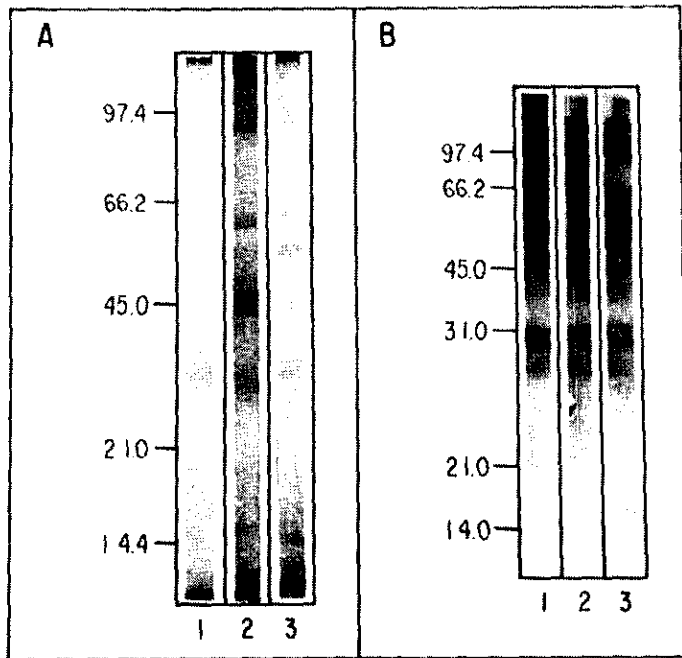


Fig. 1 INMUNODETECCION DE COMPONENTES PROTEICOS EN QC, QI y QIMC DE *Giardia lamblia* CON ANTICUERPO ANTI-QUISTE.

Panel A. La electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, se efectuó con 20 μ l de extracto proteico de QC (carril 1), QI (carril 2) y QIMC (carril 3).

Panel B. La presencia de polipéptidos fue revelada con el empleo de anticuerpos de borrego anti-quiste 1:200, QC(carril 1) QI(carril 2) y QIMC (carril 3).

En los ensayos de inmunoelectrotransferencia con anticuerpos policlonales de borrego anti-quiste, se reconocieron polipéptidos con PM aparente que fluctuaron entre 30 y 200 kDa. Asimismo se revelaron por lo menos de 12 a 15 polipéptidos compartidos en todos los carriles. Es evidente que el número de proteínas reveladas en el carril que contiene los polipéptidos de QIMC, el reconocimiento fue marcado (Fig. 1-B)

INMUNOFLUORESCENCIA CON ANTICUERPOS ANTI-QUISTE EN TROFOZOITOS Y QUISTES

En estudios de inmunofluorescencia con los anticuerpos de borrego anti-quiste se observó que éstos reconocieron tanto a los quistes, como a los trofozoítos de *G. lamblia* (Fig. 2 y 3) y también al control de trofozoítos de *G. duodenalis* de la cepa Portland-1.

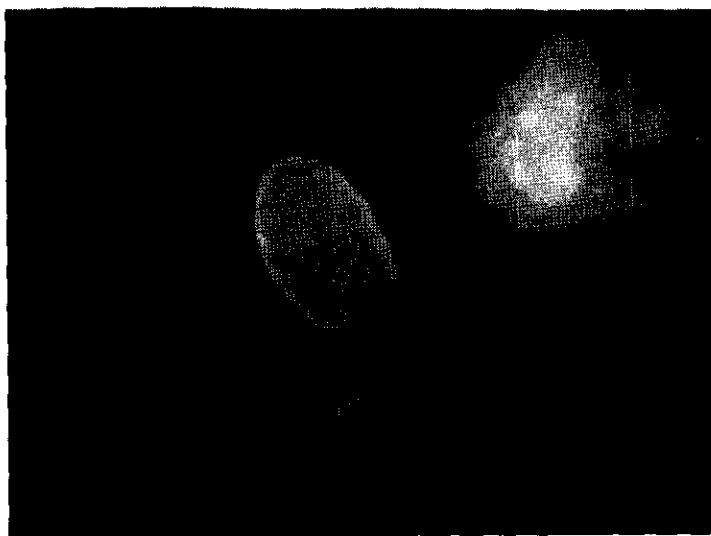
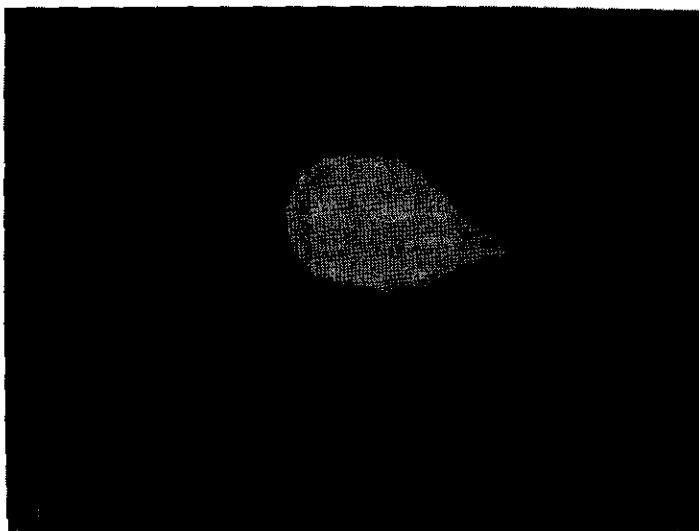


Fig. 2 y 3 INMUNOFLUORESCENCIA DE TROFOZOITOS Y QUISTES DE *Giardia lamblia*, CON ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-QUISTE. 100x

Frotis de trofozoitos y quistes de *G. lamblia* fijados con formaldehído al 1.85% y glutaldehído al 0.125%, 15 min a 37°. Tratados con anticuerpo policlonal de borrego anti-quiste, de acuerdo a lo descrito en material y métodos.

EXTRACCION DE CaM BOVINA

Con el propósito de obtener anticuerpos específicos anti-calmodulina se llevaron a cabo cuatro extracciones de CaM a partir de 300 g de testículos bovinos, en cada ocasión; de acuerdo a la técnica descrita por Gopalakishna, 1982. Los resultados se pueden observar en la Tabla 1.

**TABLA 1 EXTRACCION DE CALMODULINA
BOVINA**

EXTRACCION	CONCENTRACION DE PROTEINA
Primera	1.00 mg/ml
Segunda	1.00 mg/ml
Tercera	1.42 mg/ml
Cuarta	1.95 mg/ml

DETERMINACION DE CaM POR ELISA EN QC, QI y QIMC

La presencia de CaM en QC, QI y QIMC se determinó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CaM 1:800 (obtenido en el laboratorio). En estos el promedio de lectura de densidad óptica, de tres ensayos, fueron positivas con un valor de corte ≥ 0.5 , de 0.541 para QC, 1.23 para QI y 1.62 para QIMC. Con el empleo del anticuerpo policlonal de conejo anti-CaM donado por la Dra. G. Benítez 1:800, el promedio fue de QC 0.57, QI 1.30 y QIMC 1.72.

DETECCION DE CaM POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN QC Y QI

Con el propósito de estudiar la redistribución de la CaM durante el desenquistamiento, se detectó ésta con anticuerpos específicos anti-CaM por inmunofluorescencia. En los quistes de *G. lamblia* recién aislados (QN) se observó la calmodulina difusa en todo el quiste (Fig. 4A).

En los quistes inducidos (QI) la inmunofluorescencia se incrementó en la pared del quiste, además de observarse muy brillante en el citoplasma, en donde se marcan algunas estructuras internas (axóstilo) (Fig. 4B).

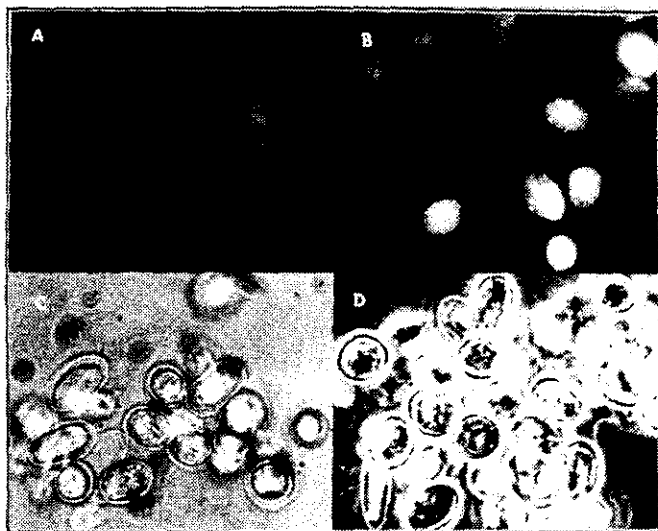


Fig. 4 QUISTES COMPLETOS (QC) Y CON INDUCCION DE DESENQUISTAMIENTO (QI) DE *Giardia lamblia*, EN INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CON ANTI-CUERPO POLICLONAL DE CONEJO ANTI-CALMODULINA.

Panel A. Quistes completos (QC) que muestra la marca fluorescente difusa en todo el quiste.
Aumento 100x

Panel B. Quiste inducido (QI) que muestra en forma muy intensa la fluorescencia en el citoplasma, se marcan algunas estructuras internas (axóstiolo).
Aumento 100x.

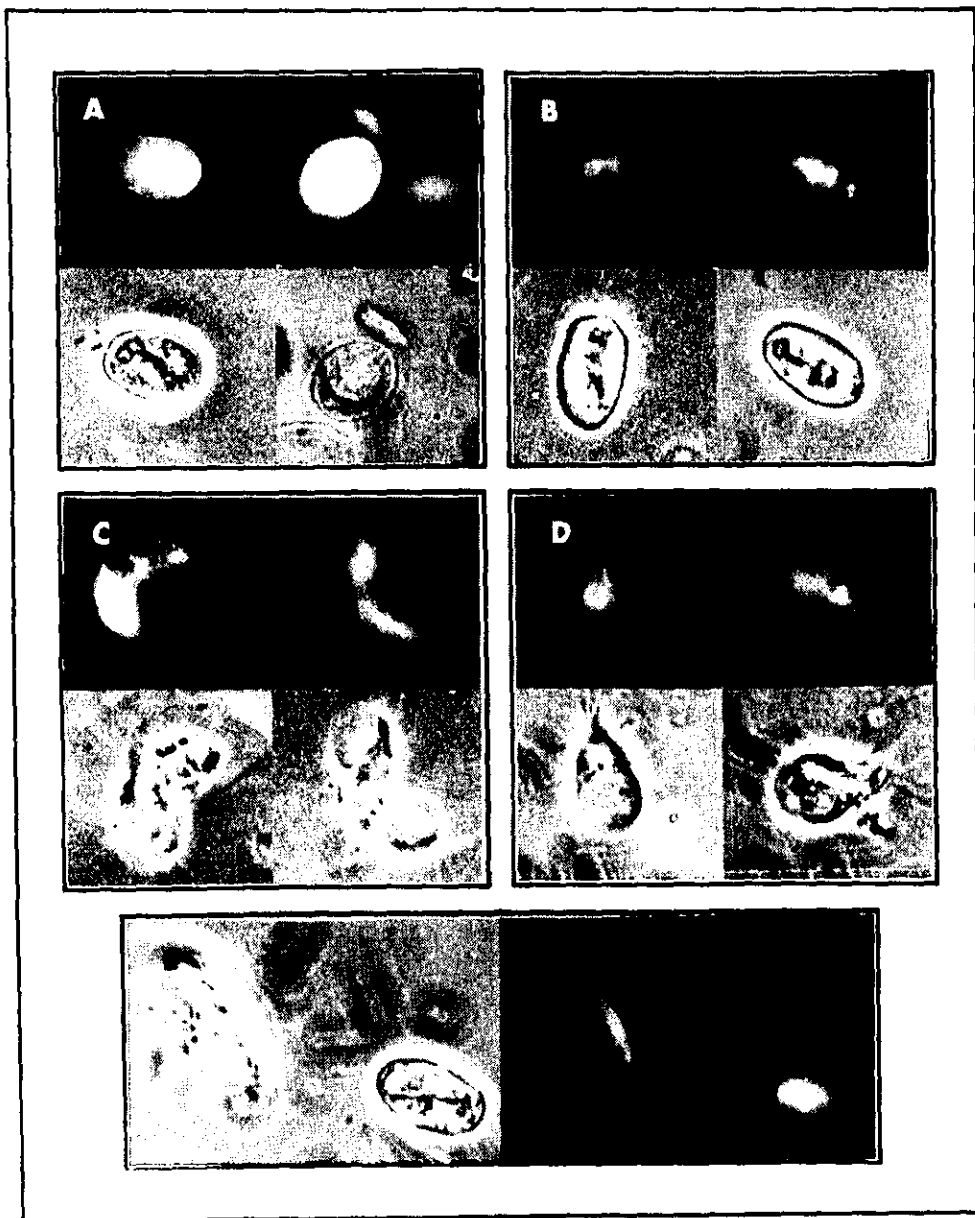


Fig. 5 OBSERVACION DE LA REDISTRIBUCION DE CALMODULINA DURANTE EL DESENQUISTAMIENTO DE *Giardia lamblia*. MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA CON ANTICUERPO POLICLONAL anti-CaM
 Panel A y B. Quistes inducidos en los primeros segundos.
 Panel C, D y E. Eclosión de los trofozoítos

REDISTRIBUCION DE CaM POR IFI EN QIMC

Posteriormente en los quistes inducidos (Fig. 5A) y puestos en el medio de cultivo B-S-Bb (QIMC) la fluorescencia se observó nuevamente en la membrana aunque se ve polarizada en el extremo donde se forma la "burbuja", una de las primeras estructuras que se presentan en el proceso de desenquistamiento (Fig. 5B). De cinco a diez minutos después de haberse colocado los quistes inducidos en el medio de cultivo, la polarización de la fluorescencia se observó en el extremo donde ocurrió la eclosión y la fluorescencia se muestra claramente en el disco adhesivo de los trofozoitos que permanecen unidos por el extremo del canal ventral (Fig. 5C).

Los trofozoitos recién eclosionados y en forma independiente, mostraron una concentración de la fluorescencia en el disco adhesivo localizado en la región ventral (Fig. 5D). Los quistes inducidos que no eclosionaron, presentan fluorescencia en toda la superficie y los trofozoitos la muestran claramente (Fig. 5E).

CUANTIFICACION DE CaM MEDIANTE LA ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA DEL AMPc.

Para averiguar si el extracto protéico obtenido de los quistes completos (QC) y quistes inducidos (QI), contenía

actividad de CaM se realizó una prueba de activación de la fosfodiesterasa del AMPc. La activación de la fosfodiesterasa de corazón bovino fue estimulada a su nivel máximo con 1.0 µg de CaM bovina y la velocidad máxima alcanzada fue de 11 nmoles en 30 minutos.

Sin embargo esta actividad fue menor cuando se usaron los extractos proteicos de quistes de *G. lamblia*, la cantidad de proteína de QC y QI necesaria para alcanzar la mayor activación de la fosfodiesterasa fue también de 1.0 µg para los dos casos, pero en el caso de QC la velocidad máxima fue 8.8 nmoles y para QI de 9.4 nmoles. Los cálculos sobre la gráfica muestran que con 0.32 µg de extracto proteico de QC y 0.25 µg de QI se logró el 50% de activación de la fosfodiesterasa. Al convertir a unidades de CaM por milígramo de proteína (UCaM/mgP), se obtuvieron 3125 para los QC y 4000 para los QI (Tabla 2). Los resultados muestran un incremento en la actividad de CaM de QI en comparación a QC, con una significancia $p < 0.05$.

**TABLA 2 ACTIVACION DE LA FOSFODIESTERASA
POR CALMODULINA DE *Giardia lamblia***

MUESTRA	U CaM/mg de proteína
QUISTES NORMALES	3125
QUISTES INDUCIDOS	4000

UCaM: Concentración de la proteína necesaria para lograr el 50% de la activación de la fosfodiesterasa del AMPc. t-student $p < 0.05$

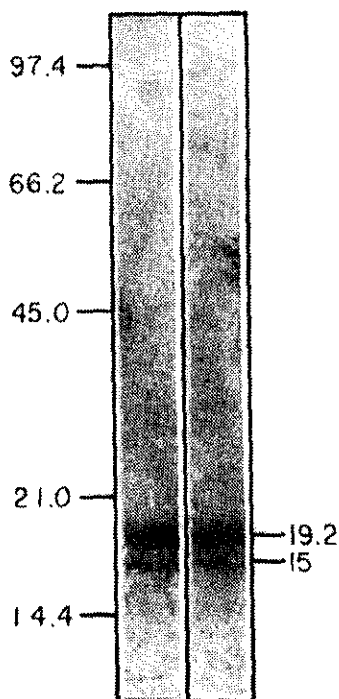


Fig. 6 INMUNODETECCION DE CALMODULINA (CaM) EN QUISTES COMPLETOS(QC)Y EN QUISTES CON INDUCCION DE DESENQUISTAMIENTO (QI) DE *Giardia lamblia*, CON ANTICUERPO POLICLONAL DE CONEJO ANTI-CaM.

Veinte ug de extracto proteico de quistes completos (QC) y de quistes con inducción de desenquistamiento (QI), se separó en un gel de poliacrilamida al 10% y después fue electrotransferido a papel PVDF, en condiciones húmedas con amortiguador de fosfatos, en una corriente a 20 volts toda la noche a 4°C.

El papel de PVDF fue revelado con anticuerpo de conejo anti-CaM 1:800, 2° anticuerpo anti-conejo biotinilado, al final estreptoavidina-fosfatasa /NBT-BCIP.

Carril 1. Quistes completos (QC)

Carril 2. Quistes con inducción de desenquistamiento (QI)

INMUNODETECCION DE CaM EN QC Y QI.

La determinación de calmodulina con el empleo de la técnica de slot blot, con un anticuerpo de conejo anti-CaM, permitió poner de manifiesto la presencia de esta proteína en QC y QI. La calmodulina también se detectó por inmunoelectrotransferencia en papel PVDF con el empleo de un anticuerpo policlonal de conejo anti-CaM. Los resultados mostraron dos proteínas compatibles con CaM en los extractos de QC (caril 1) y extractos de QI (carril 2) con peso molecular de 15 y 19 kDa (Fig. 6) las cuales son similares en PM a lo reportado para la CaM de trofozoítos de *G. lamblia* (Muñoz y col, 1987).

EVALUACION DE LA PARTICIPACION DE CaM EN EL PROCESO DE DESENQUISTAMIENTO

Con el propósito de determinar la posible participación de CaM en el proceso de desenquistación, se incubaron quistes recién aislados con los diferentes antagonistas de calmodulina. En el caso de trifluoperazina (TFP) desde la primera concentración de 1.0 μM disminuyó el porcentaje de desenquistación al 84.4%, con una inhibición del 11.6%. La mayor inhibición, del 45.1%, se alcanzó en una concentración de 15.0 μM , es decir sólo el 54.9% de los QI completó la eclosión. La concentración cero, sin antagonista, con sólo la presencia del solvente DMSO se consideró como el 100% de desenquistación, similar a las condiciones normales cuando los quistes no fueron tratados

con antagonistas, ni con DMSO (Fig. 7A). La viabilidad de los quistes fue del 80% y de 100% de los no tratados.

Cuando los quistes fueron tratados con W-7, un compuesto menos tóxico, la máxima inhibición fue de 52% a la concentración de 50.0 μM , es decir sólo el 48.0% de los quistes lograron la eclosión. A la concentración de 10 μM la desenquistación fue de un 56.6%. El testigo sin compuesto correspondió a las muestras incubadas con solvente DMSO (Fig. 7B).

TABLA 3 EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DE CaM SOBRE EL DESENQUISTAMIENTO DE *Giardia lamblia*

COMPUESTO	IC ₅₀
TFP	15.0 μM
W-7	20.0 μM
W-5	N.E.
H-7	N.E.

IC₅₀: concentración de los antagonistas para lograr el 50% de inhibición del desenquistamiento. Cada valor representa la media del ensayo por cuadruplicado. N.E. no se observó efecto.

El antagonista W-5 es estructuralmente similar a W-7, y sólo varía en la presencia de un átomo de cloro. Esta variación en su fórmula impide que interactue con CaM, por

lo tanto carece de efecto, por lo cual se uso como testigo. Para descartar que el efecto de los antagonistas sea sobre las proteínas cinasas se empleó el inhibidor H-7. Los resultados mostraron que ambos compuestos no tienen ningún efecto. (Tabla 3).

EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DE CaM DURANTE LA ECLOSION DE LOS TROFOZOITOS DE *G. lamblia*.

Al considerar que el papel de la CaM puede ser importante no sólo antes de inducir el desenquistamiento, sino también después de la inducción durante el proceso de eclosión de los trofozoítos, los quistes inducidos fueron tratados con los diferentes antagonistas de CaM y con el inhibidor de proteína cinasa como control. Los resultados mostraron que con empleo de TFP en concentraciones de 1.0 μM a 15.0 μM , la eclosión de los trofozoítos se logró obtener en un 20% en la concentración de 1.0 μM . (Fig. 7C). La viabilidad de los quistes y los trofozoítos se mantuvo en un 80%.

En el caso de W-7 a concentraciones 10.0 y 15.0 μM el porcentaje de eclosión fue alrededor del 80%; éste disminuyó a 76% cuando se emplearon concentraciones de 20.0 μM , se redujo 70% en concentración de 25.0 μM ; descendió en forma importante a 52%, en concentraciones de 50.0 μM . (Fig. 7D). La viabilidad de los quistes sin desenquistar fue del 80%.

El control de W-5 y el inhibidor de la proteína cinasa H-7 no mostraron ningún efecto.

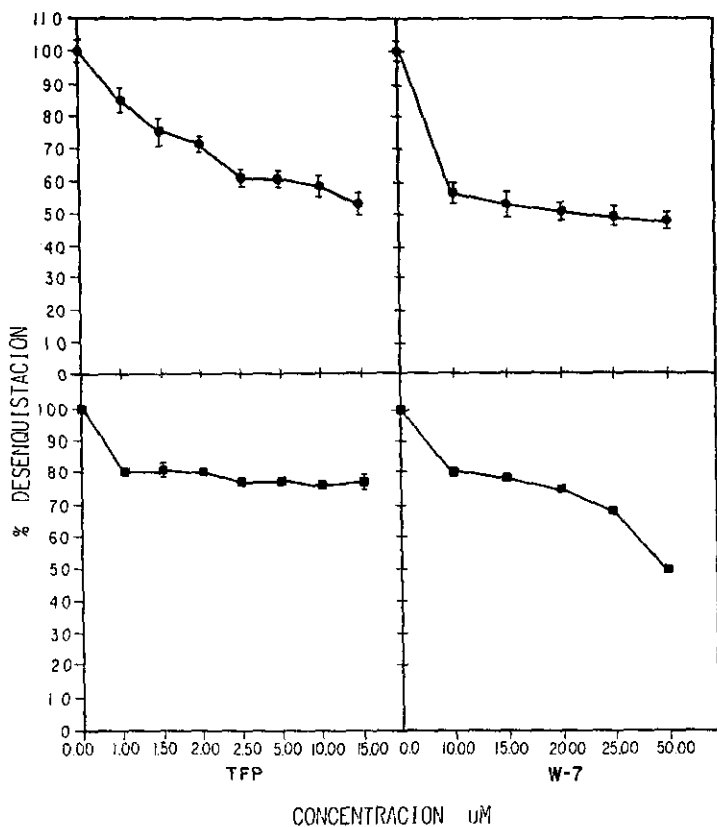


Fig. 7 PORCENTAJE DE DESENQUISTACION DE QUISTES DE *G. lamblia* DESPUES DEL TRATAMIENTO CON LOS ANTAGONISTAS DE CaM, TRIFLUOPERACINA (TFP) Y N-(6-aminohehexil)-1-(naphthalenosulfonamida) (W-7).

Panel A. TFP Panel B. W-7

PORCENTAJE DE DESENQUISTACION DE QUISTES INDUCIDOS (QI) DE *G. lamblia* COLOCADOS EN MEDIO DE CULTIVO SUPLEMENTADO CON LOS ANTAGONISTAS DE CaM, Trifluoperacina (TFP) Y N-(6-aminohehexil)-1-(naphthalenosulfonamida) (W-7).

Panel C. TFP Panel D. W-7

FOSFOPROTEINAS DE QUISTES A DIFERENTES TIEMPOS DE INDUCCION DE DESENQUISTAMIENTO

Muchas proteínas dependientes de CaM están involucradas en la transmisión de señales mediante fosforilación/desfosforilación, en un evento como la inducción de desenquistación varias proteínas debían ser fosforiladas durante el proceso. El corrimiento en gel de poliacrilamida al 10%, teñido con nitrato de plata, mostró que desde los 10 a 60 minutos de inducción se presentaban cuatro proteínas dominantes de 22, 37, 45 y 61 kDa aproximadamente. Las proteínas de 45 y 61 fueron compartidas en todos los tiempos (Fig. 8A). La autorradiografía después de cuatro días de exposición reveló las fosfoproteínas con PM aparentes de 29, 62, 78 y 85 kDa en el carril cuatro, que corresponde al tiempo de inducción de 40 minutos, en donde se obtiene el mayor porcentaje de desenquistación. No se observaron fosfoproteínas en otros tiempos de inducción (Fig. 8B).

FOSFOPROTEINAS DE QC, QI y QIMC, EN CONDICIONES NORMALES

La electroforesis en gel de poliacrilamida demostró en todos los carriles, siete proteínas con PM aparentes entre 10 a 100 kDa. (10, 17, 30, 45, 70, 90 y 100), sólo con mayor intensidad en el carril 4 que corresponde a QIMC. En los carriles 3 (QI) y 2 (QC), se marcó claramente un doblete entre 45 y 50 kDa y otra proteína de 30 kDa, más

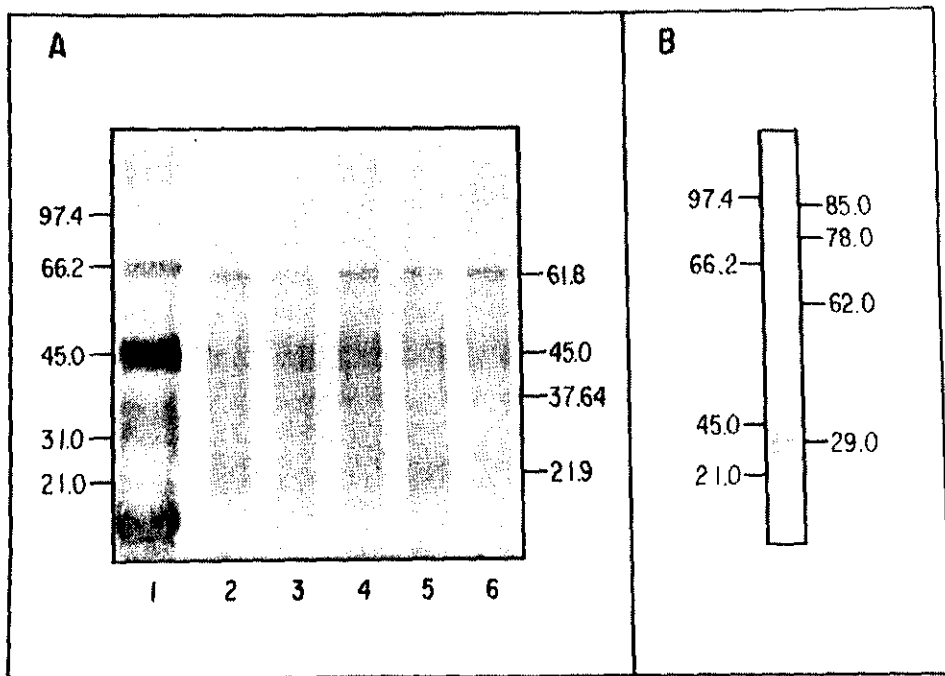


Fig. 8 POLIPEPTIDOS Y FOSFOPROTEINAS DE QUISTES *G.lamblia* A DIFERENTES TIEMPOS DE INDUCCION DE DESENQUISTAMIENTO.

Un total de 200 millones de quistes de *G. lamblia* fueron incubados con 0.4 mCi de ortofosfato. Posteriormente se dividieron en cinco alícuotas y fueron sometidos a diferentes tiempos de inducción 10, 20, 30, 40 y 60 min a 37°C.

Panel A. Los diferentes alícuotas de quistes se rompieron por la acción del amortiguador de muestra y ebullición. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%. Teñido con nitrato de plata Carril 1. Marcadores de peso molecular

Carril 2. 10 min.

Carril 3. 20 min.

Carril 4. 30 min.

Carril 5. 40 min.

Carril 6. 60 min.

Panel B. El gel teñido y seco se colocó en cassette sobre una placa radiográfica, se expuso cuatro días, a -70°C.

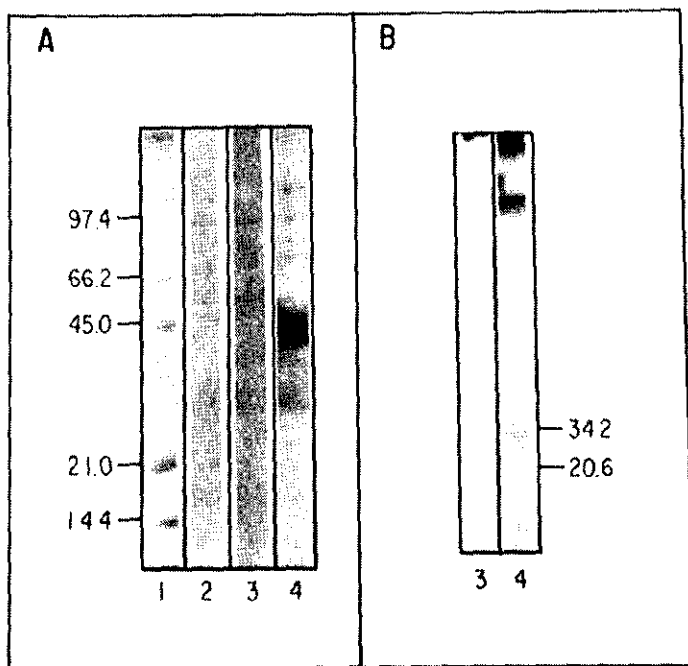


Fig. 9 FOSFOPROTEINAS DETECTADAS EN QUISTES COMPLETOS (QC) QUISTES CON INDUCCION DE DESENQUISTAMIENTO (QI) Y QUISTES CON INDUCCION COLOCADOS EN MEDIO DE CULTIVO (QIMC).

Un total de 200 millones de quistes le incorporaron 0.4 mCi de ortofosfato después se dividieron en QC, QI y QIMC, se rompieron por la acción del amortiguador de muestra y la ebullición.

Panel A. Se colocaron 20 μ l en cada carril en un gel de poliacrilamida al 10%. Tinción de Coomassie
 Carril 1. Marcadores de peso molecular
 Carril 2. QC Carril 3. QI Carril 4. QIMC

Panel B. Fosfoproteínas expuestas sobre una placa radiográfica por 50 minutos a -70°C .
 Carril 3. QI Carril 4. QIMC

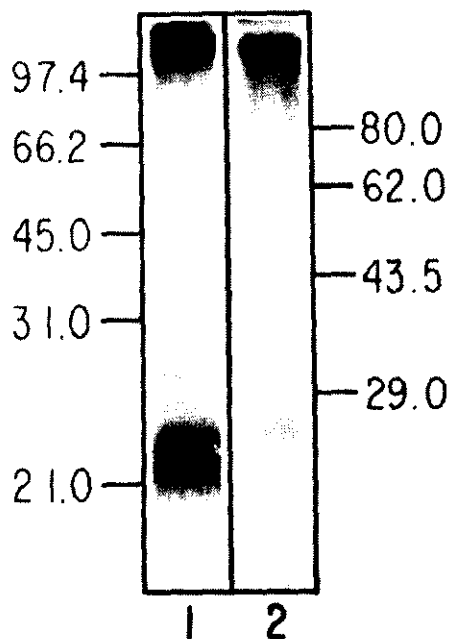


Fig. 10 FOSFOPROTEINAS DE QUISTES DE *G. lamblia* PERMEABILIZADOS.

Cuatro alícuotas de quistes de *G. lamblia* con 50 millones cada uno, se resuspendieron en concentraciones de Tritón X-100 de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5%. Se incubaron con 0.1 mCi de ortofosfato, para su incorporación. Después del marcaje los quistes se sometieron a la inducción del desenquistamiento. Los quistes se rompieron con amortiguador de muestra y ebullición.

Se colocaron 20 μ l de extracto en cada carril en un gel de poliacrilamida al 10%.

El gel teñido con Coomassie y seco, fue colocado sobre una placa radiográfica a -70°C , durante 50 horas de exposición.

Carril 1. Tritón X-100 al 0.5%

Carril 2. Tritón X-100 al 0.2%.

acentuada que en el carril 4 (Fig. 9A). En la autorradiografía de estos quistes, las fosfoproteínas que se reconocieron en el carril 4 (QIMC) y 3 (QI), tienen PM aparentes de 20 y 34 kDa (Fig. 9B).

FOSFOPROTEINAS DE QUISTES PERMEABILIZADOS

Los resultados de la autorradiografía de quistes inducidos mostró en el carril uno (tritón 0.5%) y dos (tritón 0.2%), tres fosfoproteínas con PM aparentes de 29, 43, 62 y 80 kDa (Fig. 10).

FOSFOPROTEINAS DE QUISTES TRATADOS CON RIPA

Se logró la ruptura de los quistes con el tratamiento del amortiguador de muestra y ebullición, para un mayor rompimiento, en este ensayo además se agregó a las muestras de quistes amortiguador de RIPA e inhibidores de fosfatasa. La autorradiografía para quistes completos más RIPA (QC+RIPA), señaló tres proteínas con PM aparentes de 22, 30 y 66 kDa que fueron más acentuadas en los quistes inducidos más RIPA (QI+RIPA) y además con la aparición de una proteína de 88 kDa (Fig. 11).

FOSFOPROTEINAS DE QUISTES TRATADOS CON TPA

Con el propósito de determinar si las fosfoproteínas presentes en los geles pudieran corresponder a cinasas dependientes del complejo Ca^{2+}/CaM , se montó un ensayo con el empleo de acetato de tetra deconoil forbol (TPA)

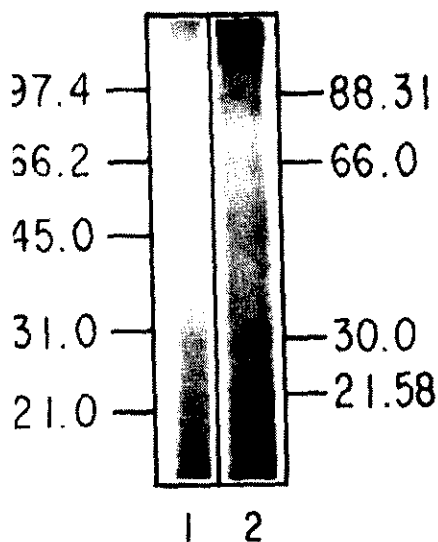


Fig. 11 FOSFOPROTEINAS DE QUISTES DE *G. lamblia* TRATADOS CON AMORTIGUADOR RIPA.

A 100 millones de quistes de *G. lamblia* se le incorporó 0.2 mCi de ortofosfato y además se trataron con el amortiguador RIPA. Se dividieron en dos alícuotas para QC y QI.

Los quistes se rompieron con amortiguador de muestra y ebullición. Se colocaron 20 µl por carril en un gel de poliacrilamida al 7.5% y se sometieron a electroforesis.

El gel teñido con Coomassie y seco, fue colocado sobre una placa radiográfica a -70°C, 50 horas.

Un carril con marcadores de peso molecular

Carril 1. Quistes completos (QC)

Carril 2. Quistes inducidos (QI)

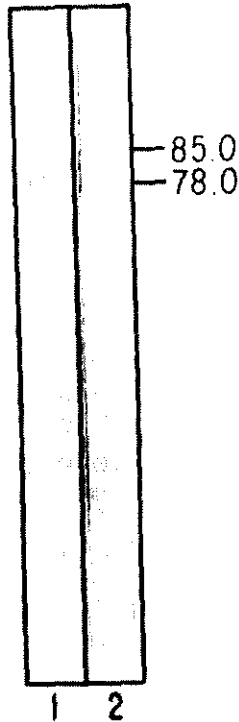


Fig. 12 INMUNODETECCION DE FOSFOTIROSINA EN QUISTES COMPLETOS E INDUCIDOS DE *G. lamblia*

A 100 millones de quistes de *G. lamblia* les fue incorporado 0.2 mCi de ortofosfato. Se dividieron en dos alícuotas para QC y QI. Los quistes se rompieron con amortiguador de muestra y ebullición. Se colocaron 20 μ l por carril en un gel de poliacrilamida al 10% y se sometieron a electroforesis. El gel fue electrotransferido a papel de nitrocelulosa y revelado con anticuerpo monoclonal anti-tirosina, mediante la técnica de fosfatasa/NTB-BCIP.

Carril 1. Quistes completos (QC)
 Carril 2. Quistes inducidos (QI)

activador de la PKC. Los resultados en la autorradiografía no indican activación en forma marcada (no se muestra figura).

INMUNODETECCION DE FOSFOTIROSINA

La inmunodetección con anticuerpos anti-fosfotirosina en quistes normales y quistes^o inducidos, mostró un doblete con PM aparentes entre 78 y 85 kDa (Fig. 12).

INMUNODETECCION DE PROTEINA CINASA II

La electrotransferencia revelada con anti-multiproteína cinasa II (MPKII) 1:800 y técnica de peroxidasa-luminol; dió resultado positivo en los tres carriles de QN, QI y QIMC, que mostraron un doblete con peso molecular aparentes de 58.0 y 51.0 kDa (Fig. 13). En esta figura no se aprecia ninguna diferencia significativa entre las muestras.

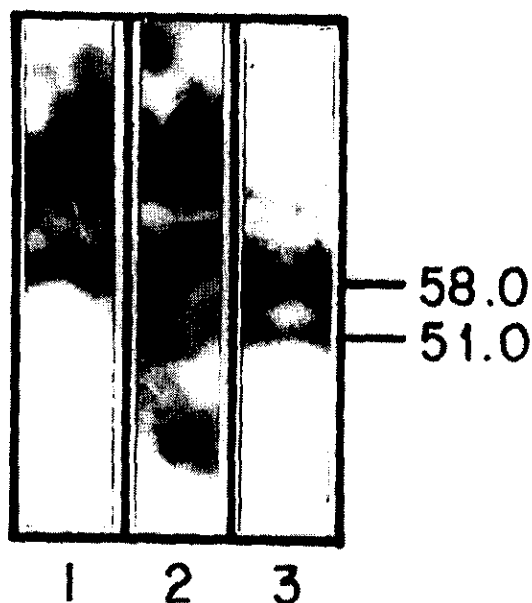


Fig. 13 INMUNODETECCION DE MULTIPROTEINA CINASA II (MPK II) EN EXTRACTOS DE QUISTES COMPLETOS E INDUCIDOS DE *G. lamblia* .

Un total de 100 millones de quistes se dividieron en dos alícuotas para QC y Q con inducción del desenquistamiento.

Los quistes se rompieron con amortiguador de muestra y ebullición. Se colocaron 20 µl por carril en un gel de poliacrilamida al 10.0% y se sometieron a electroforesis.

El gel fue electrotransferido al papel de nitrocelulosa en condiciones húmedas con amortiguador Tris-glicina-metanol. Después de la electrotransferencia la membrana se reveló con anticuerpo anti-MPK-II 1:800, mediante peroxidasa-luminol.

El gel se colocó sobre una placa radiográfica, 2 min.

Carril 1. Quistes completos (QC)

Carril 2. Quistes inducidos (QI)

Carril 3. Quistes inducidos en medio de cultivo (QIMC)

D I S C U S I O N

Diferentes autores han demostrado que la desenquistación en *G. lamblia* es un proceso inducible, que las condiciones presentes en el estómago de los huéspedes naturales satisfacen las necesidades para iniciar el proceso de inducción y que éstas han sido reproducidas "in vitro". Aunque se han identificado algunas de las condiciones extrínsecas que inducen el desenquistamiento y se han descrito la secuencia de eventos de la citocinesis para la formación y liberación de dos trofozoitos por quiste (Hegner 1924, Bingham y Meyer, 1979, Bernal 1990, Boucher y Gillin 1990, Coggins y Schaefer 1984 y 1986, Feely 1986). Sin embargo hasta la fecha los mecanismos moleculares que regulan el desenquistamiento y llevan a la formación de dos nuevas células son poco conocidos.

El primer objetivo se propuso para cuantificar y localizar CaM durante el desenquistamiento. Se sabe que el estímulo externo desencadena una serie de señales, en donde participa calcio y proteínas que unen calcio, como calmodulina, además de nucleótidos cíclicos como AMPc y cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM y de AMPc.

La inducción sobre un receptor ligado a la adenilato ciclasa de la membrana celular, incrementa la concentración intracelular del AMPc, y la degradación de éste nucleótido cíclico se inicia de inmediato a través de la fosfodiesterasa del AMPc/ Ca^{2+} -CaM, para originar 5'AMP y finalmente fosfato

inorgánico [Pi]. Desde 1987 fue demostrado que la CaM obtenida de trofozoitos de *G. lamblia*, estimula la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc, la concentración requerida para la máxima activación es de 25 nM, la cual es el doble de la requerida para CaM bovina, 12.5 nM (Muñoz y cols, 1987). Para nuestro modelo de desenquistación "in vitro" fue demostrada la activación de la fosfodiesterasa del AMPc con el empleo de un extracto total proteico de quistes completos (QC) y quistes con inducción de desenquistamiento (QI).

En los QC y QI de *G. lamblia* la máxima activación de la fosfodiesterasa se logró con 1.0 µg de extracto y se alcanzaron 8.8 nmol y 9.4 nmol respectivamente. Los cálculos indican que con 0.32 µg de extracto de QC y 0.25 µg de QI se logra el 50% de activación de la fosfodiesterasa. Ambos extractos alcanzaron el 50% de activación pero los QC requieren de mayor cantidad de proteína que los QI. La CaM de QC alcanzó el 80% y QI el 85% de la activación máxima inducida por calmodulina bovina, utilizada como control en los ensayos.

Rasmussen propone que los cambios en el metabolismo del AMPc por enzimas dependientes de Ca^{2+} /CaM intervienen en los cambios morfológicos de la célula (Rasmussen y Means, 1992). De manera el incremento de UCaM/mg para QC de 3125 que se eleva a 4000 en QI, con diferencia significativa de $p < 0.05$ (Tabla 2) podría guardar relación con los cambios morfológicos que se están llevando a cabo en el interior del quiste, para la formación de los nuevos trofozoitos.

La inmunoelectrotransferencia de QC y QI revelado con anticuerpos anti-CaM (Fig.6) apoyan la presencia de CaM durante el proceso de desenquistamiento, corresponden al peso molecular descrito para trofozoitos de *G. lamblia* que sugiere un PM de 19 kDa (Muñoz y cols, 1987), un peso molecular similar para CaM de trofozoitos de *E. histolytica* (Muñoz y cols, 1991) y para la CaM del tegumento del adulto de *S. mansoni* (Thompson y cols, 1986). Otros protozoarios parásitos presentan una CaM con PM entre 15 y 16 kDa, similar a la segunda proteína que se detecta en los QC y QI (Fig. 6).

Los títulos de absorbancia del ensayo inmunoenzimático (ELISA) así como la técnica de Slot blot resultaron positivos para CaM en QC y QI, esta técnica cuantitativa nos permite proponer la presencia de calmodulina en *G. lamblia*.

Existe un importante número de compuestos que interfieren con la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM y la unión de éste a una enzima; la acción de estos antagonistas ha sido ampliamente utilizado para identificar la participación de CaM en diversas funciones biológicas. En nuestros ensayos en donde se emplearon a los antagonistas de CaM para demostrar la participación de ésta en el proceso de desenquistación, los compuestos como TFP y W-7 tuvieron una acción inhibitoria en la desenquistación, sobre quistes inducidos de *G. lamblia* en porcentajes de 45% y 52% respectivamente, mostrados en la Fig. 7,A-B.

El inhibidor más efectivo en el proceso de desenquistación fue TFP, con IC_{50} de 15.0 μM , que conserva

una viabilidad del 100% para trofozoitos y mayor del 80.0% para los quistes que no desenguistaron, lo que indica que la toxicidad del compuesto fue muy baja, también fue reportando por Ruben y cols en 1983 para *T.b.rodesiense*. Para W-7 el IC_{50} fue menor a 20.0 μM , manteniendose el 90.0% de los quistes que no desenguistaron viables (Tabla 3).

La dosis efectiva al 50% (ED_{50}) requerida para reducir el crecimiento "in vitro" de *P. falciparum* a la mitad después de la exposición por tres días con ciclosporina A (Sheibel y cols, 1987) es para W-7 de 2.1 μM , de 1.9 μM para W-7. En este trabajo el ED_{50} requerida para reducir al 50%, "in vitro" la desenguistación de *G. lamblia* después de 16 horas de exposición a los antagonistas fue 15.0 μM para TFP y <20 μM para W-7. Lo que sugiere fuertemente que el efecto de antagonistas es sobre la CaM del parásito.

En otros modelos como *L. donovani* el empleo de antagonistas ha permitido demostrar la participación de enzimas específicas en la penetración del parásito a la célula huésped (Pearson, 1982). Cuando los macrófagos son tratados con inhibidores de PKC, no existe daño sobre el parásito invasor, esto se demuestra por el incremento en la cantidad de amastigotes presentes en las células; en contraste cuando los macrófagos son tratados con inhibidores de cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM la proliferación de promastigotes es dañada por estos inhibidores (Moore y cols, 1993). Igualmente ha sido demostrado "in vitro" que la proliferación de promastigotes en el medio de cultivo, se ve

inhibido en forma específica con la presencia de cinasas dependiente de Ca^{2+} -CaM. Estos estudios nos apoyan en el sentido de que la especificidad de los inhibidores, puede ser utilizada para determinar la participación de una enzima en un evento determinado.

El uso de antagonistas de CaM podría ser empleado en el tratamiento de enfermedades parasitarias, tenemos varios ejemplos de fármacos que tienen una acción sobre CaM utilizado como medicamento, como es el caso de la ciclosporina para *P. falciparum*. Lo importante sería poder contar con un fármaco cuyo mecanismo de acción fuera específico contra la CaM del parásito y concretamente actuara sobre la zona de la molécula que es diferente a la CaM del huésped. Estas diferencias están demostradas en *T. cruzi*, cuyos análisis bioquímicos han permitido conocer las características estructurales de la CaM del parásito y la del huésped. Aunque la molécula de CaM se encuentra más o menos conservada en toda la escala filogenética de los eucariontes, se ha demostrado en forma particular, variaciones en la estructura molecular de cada una de ellas, que podrían ser utilizadas en forma específica para la acción de las drogas (Mannhol y Timmerman, 1992).

El empleo de inhibidores de proteína cinasa C, como H-7, en ensayos de desenquistación "in vitro" no tienen ningún efecto, lo cual indica que la inhibición de desenquistamiento no está regulada por PKC. Cuando se agregó acetato de decanoil forbol (TPA) activador de PKC a los quistes tratados

con ortofosfato [^{32}P], antes de de inducción de desenquistamiento, éste no tuvo ningún efecto sobre las fosfoproteínas.

El compuesto TFP tiene una afinidad más alta por el complejo Ca^{2+} -CaM que W-7 (Garolfo y cols, 1983). La carencia de efecto de W-5 tiene una explicación, a pesar de ser una molécula muy parecida a W-7, la diferencia en la presencia de un cloro hace que la afinidad hacia el complejo Ca^{2+} -CaM sea prácticamente nula. El W-5 no tiene ningún efecto (Tabla 3).

La administración de antagonistas de CaM sobre los cultivos de células CHO provoca la redondez, la acción es reversible, lo que indica que la droga no altera la viabilidad de la célula (Chafouleas y cols, 1982). En los ensayos presentados en esta tesis, después del tratamiento a los quistes con los antagonistas de CaM, cuando se revisa la viabilidad de los que no desenquistaron y de los trofozoitos obtenidos en los medios de cultivo, se encuentra un porcentaje del 100% para los trofozoitos y del 80% al 100% para los quistes, esto tanto para TFP, como para W-7 y sin ningún efecto por W-5 y H-7, lo que indica que ninguno de los compuestos fue tóxico para los quistes.

En el segundo tipo de ensayo cuando los quistes sufrieron la inducción de desenquistamiento y posteriormente fueron colocados en medio de cultivo suplementado con las diferentes concentraciones de antagonistas, el efecto que se tuvo sobre la desenquistación fue menor, posiblemente debido a que el proceso de desenquistación se inició antes de la

unión con el antagonista y esta inducción es mucho más rápida que la acción que de estos compuestos (Fig. 7, C-D). En las condiciones de este ensayo los antagonistas presentes en el medio de cultivo no tiene ningun efecto sobre la viabilidad de los quistes y trofozoitos.

La técnica de inmunofluorescencia con el empleo de anticuerpos policlonales anti-CaM muestra en QC, la marca fluorescente en todo el borde de la pared quística y con mayor intensidad en los QI (Fig. 4A y 4B). Además permitió seguir la redistribución de la CaM en los quistes que sufren la inducción del desenguistamiento. La marca fluorescente se localizó en la periferia del quiste inducido y desde los primeros pasos en los que aparece la polarización y la formación de la "burbuja" se hizo muy evidente en esos sitios, también muy remarcada en el disco adhesivo de los trofozoitos recién eclosionados (Fig.5A-E). Resultados similares se demostraron en el caso de la formación y liberación de las yemas en las células levaduriformes de *Saccharomyces cerevisiae*, en donde la CaM se concentra en el sitio de origen de la yema, más o menos 10 minutos antes de que ésta emerge, en una interacción con el citoesqueleto de la célula (Brockerhoff y Davis, 1992). Muy similar a la redistribución de CaM en espermatozoites de Guinea pig (cuyo), en donde puede seguirse el tiempo de 2 a 7 minutos y la movilización es dependiente del estado de la reacción acrosomal (Trejo y Mujica, 1990).

Los resultados de los diferentes estudios sugieren la participación de la CaM en el desenquistamiento, sin embargo para definir los mecanismos de acción se decidió tomar el modelo de Jackson (Jackson, 1992) quién propone que la fosforilación es la vía que facilita la información desde el estímulo extracelular hasta los factores de la transcripción en el núcleo y que se trata de un mecanismo ideal para llevar a cabo la cascada de información, por la rapidez del efecto y porque las cinasas participantes son altamente específicas. Si la fosforilación es la vía que facilita la cascada de la transducción de señales, nuestros resultados demuestran que existe fosforilación durante el proceso de desenquistación; que después de la incorporación de ortofosfato [^{32}P] a los quistes normales y someter a éstos a la inducción "in vitro", la autorradiografía reconoce la presencia de fosfoproteínas de PM aparente de 20 a 85 kDa y que dentro de este rango se encuentran cinasas dependientes del complejo Ca^{2+} -CaM.

El patrón de fosfoproteínas identificadas de QC y QI bajo condiciones normales, correspondieron a pesos moleculares de 20 y 34 kDa (Fig. 9B), para tratar de obtener mayor número de fosfoproteínas los quistes fueron permeabilizados con tritón, la autorradiografía reveló bandas de peso molecular de 29, 43, 62 y 80 kDa (Fig. 10). Al tratar a los quistes completos (QC) con amortiguador RIPA que produce lisis celular para facilitar la liberación de mayor número de proteínas, la acción de RIPA reveló las

fosfoproteínas con PM aparente de 22, 30, 66 y 88 (Fig. 11), muy similares a lo ya identificado.

La entrada de Ca^{2+} a un sistema es, en muchos casos, el disparador para los mecanismos intracelulares dependientes de él, y por consecuencia para la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} -CaM (Sheng y cols, 1990). Bronstein supone que las cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM son estimuladas por Ca^{2+} e inducen autofosforilación y continúan la cascada de señales (Bronstein, 1993); en el caso de la desenquistación, el contacto con soluciones inductoras a pH ácido favorece el intercambio de iones y parece ser el disparador discutido por Bingham y Meyer en 1979 y realizado en todos los ensayos de desenquistación de esta tesis .

Los microtúbulos han sido descritos como estructuras dinámicamente inestables, alternando entre ensamblaje y desensamblaje, las diferencias en la organización del citoesqueleto son observadas en respuesta a la elevación de CaM unida a proteínas de citoesqueleto y éstas pueden funcionar como un intermediario entre el estímulo externo y los eventos intracelulares que propagan la señal, a través del citoplasma (Rasmussen y Means, 1992). Esto ocasiona cambios en las proteínas que integran el citoesqueleto, en algunos de los cuales participan las enzimas dependientes de Ca^{2+} -CaM; dentro de ellas una de las más importantes es la multiproteína cinasa II/ Ca^{2+} -CaM que es multifuncional, y tiene como sustrato varias proteínas de citoesqueleto.

La tubulina es uno de los principales sustratos de la cinasa II/Ca²⁺-CaM-. La fosforilación de la tubulina resulta de una modificación estructural y funcional de la proteína.

La tubulina y la giardina son las principales proteínas componentes del citoesqueleto del disco adhesivo, axonemas y flagelos de los trofozoitos de *G. lamblia*, la síntesis y ensamblaje se presentan después de la inducción de desenquistamiento, cuando se forman las nuevas células. Dentro de las fosfoproteínas identificadas, la autorradiografías muestran siempre bandas de pesos moleculares de 29 y 34 similares a lo descrito para giardina (Fig. 9B, 10B) y de 43 y 45 peso molecular aparente de tubulina (Fig. 10B).

Cuando se realizó una inmunoelectrotransferencia de extractos de QC y QI y revelados con el empleo de anticuerpos antifosfotirosina, los resultados mostraron polipéptidos con pesos moleculares aparentes de 78 y 85 kDa (Fig. 12). De la misma manera, en el parásito *Trypanosoma brucei*, se han identificado proteínas tirosina-cinasa con pesos moleculares aparentes de 89 kDa en las formas que realizan división celular durante el desarrollo, los amastigotes y epimastigotes (Parson y cols, 1993), estos autores sugieren que las cinasas juegan un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación del protozario, además otros autores (Logan y cols, 1994) opinan que las fosforilaciones en residuos de tirosina son componente esencial en las señales de transducción.

La proteína cinasa multifuncional dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ juega un papel importante en la modulación de la transmisión sináptica. La cinasa permanece intacta por la presencia en su molécula de un dominio autoinhibitorio, la unión de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ hace desaparecer el efecto inhibitorio y la convierte en una cinasa activa que le permite inducir una autofosforilación y fosforilación a otros sustratos. Las proteínas asociadas a microtúbulos MAPs son sustrato de la PKA y de la $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-MPK}$; los estudios en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) las muestran en una banda polipeptídica de 51 muy prominente y en un doblete de 60 kDa (Schulman, 1984).

La autorradiografía de los quistes completos e inducidos permeabilizados con Tritón X-100 y con RIPA, marcan bandas de 62 y 66 kDa (Fig. 10 y 11); las pruebas de inmunodetección con anticuerpo policlonal anti-multiproteína cinasa II, revelan en los extractos de QN, QI y QIMC (Fig. 12) dos bandas de 51 y 58 kDa, los cuales de acuerdo al corrimiento electroforético y la identificación podrían corresponder a la multiproteína cinasa II, además debemos tomar en cuenta que la Ca^{2+} -CaM multiproteína es insoluble en esos detergentes (Cohen, 1988).

Para considerar que el efecto producido sobre la desenquistación es debido a CaM y no a PKC, en los ensayos de antagonistas se utilizó como control la acción del compuesto H-7 que es un inhibidor de PKC, los resultados de estos ensayos (Tabla 2) mostraron que no tienen ningún efecto sobre la desenquistación. Asimismo se trataron los QC con TPA,

activador de la PKC, la impresión en la autorradiografía no mostró ningún efecto activador, estos resultados sumados a los anteriores sugieren que la PKC no participa en este evento.

El aumento de Ca^{2+} intracelular y la activación de la multiproteína cinasa dependiente del complejo Ca^{2+}/CaM están implicados en las señales de transducción de las terminales sinápticas (Kuo-Ping-Huang, 1989) el incremento abastecido por la entrada de Ca^{2+} del fluido extracelular por medio de los canales dependientes de voltaje o por la liberación interna de las pozas de Ca^{2+} interviene en la cascada de la transducción de señales. Esta participación está bien identificada porque en el cerebro existe en gran cantidad la multiproteína cinasa II. Un fenómeno similar pudiera presentarse en un proceso inducido como la desenquistación, en donde la exposición de los quistes a soluciones con alto contenido de hidrogeniones (solución inductora con pH 1.6) favorezca la entrada de Na^{2+} y Ca^{2+} , que se convierta en el disparador para la cascada de la transducción de señales dentro del quiste.

La obtención de anticuerpos policlonales de borrego anti-quiste fue utilizado para demostrar la presencia de varios polipeptidos compartidos durante el proceso de desenquistación. Los antígenos de superficie en trofozoitos están bien caracterizados corresponden a un grupo de proteínas ricas en cisteína, que difieren entre cepas y muestran variación antigénica (Aggarwal y cols, 1989). Está

demostrado que estos cambios ocurren "in vitro" y también "in vivo". El principal antígeno de superficie reconocido en los trofozoitos, tiene un PM aparente de 170 kDa, que fácilmente es reemplazado por otra proteína también rica en cisteína de peso aparente entre 50 y 170 kDa (Adam, 1991). Están identificados otros antígenos de superficie ricos en cisteína de PM 66-85, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado (Gillin y cols, 1990) y un antígeno inmunodominante de 32 kDa posiblemente asociado a citoesqueleto, tal vez giardiana, comprobado mediante la identificación con un anticuerpo policlonal anti-giardina (Vinayak y cols, 1991). Cuando se utiliza un antisuero policlonal anti-quiste se revela un antígeno inmunodominante de 30 kDa y también se muestran varios polipéptidos de 45, 66, 105 y 180 kDa, igual en el corrimiento de QN y QI observado en la Fig 1A y B. Resultados similares están previamente reportado por Einfield (Einfield y Stibbs, 1984), en aislados de diferentes áreas geográficas, en donde la tinción de Comassie o de nitrato de plata tiñe escasos polipéptidos en el gel, pero al revelar con anticuerpo específico anti-quiste, el número real de polipéptidos se pone de manifiesto.

Se han identificado varios antígenos de quistes de más o menos 21, 28, 49 kDa que son reactivos a un suero policlonal de conejo anti-quiste y que no son reconocidos en extractos de trofozoitos de *G. lamblia* y sí por quistes con desenquistación "in vitro", son antígenos de 21, 28 y otro de 36 kDa. El patrón normal de corrimiento de trofozoitos

tratados con Tritón X-100 (Holberton, 1981) muestran bandas de 52 y 30 kDa, siendo el dominante el de 30 kDa. Esto mismo fue identificado por Taylor (Taylor y cols, 1987) y considerado como un antígeno dominante llamado giardina, y también otros de 27, 28, 55 y 80 kDa.

Los antígenos más utilizados para diagnóstico en sueros humanos, corresponden a proteínas de superficie, a citoesqueleto, y a los antígenos que van a constituir la pared del quiste, durante el enquistamiento. Un anticuerpo monoclonal contra quistes de *Giardia* de varias especies animales que incluyen al hombre, se utiliza para clasificar la especie, por ser especie/específico (Stibbs y cols, 1988) ya que resulta positivo al grupo de *G. duodenalis* y negativo a *G. muris*.

Otros antígenos empleados para la detección de *Giardia* son: uno con peso molecular aparente de 31 kDa que se reconoce en el suero humano de pacientes giardiásicos (Taylor y cols, 1987) y otro con aparente peso molecular de 88 (Edson y cols, 1986) también útil para el diagnóstico. Mediante técnicas de inmunoblot los sueros de pacientes sintomáticos y asintomáticos reaccionan con antígenos de PM entre 35 y 200 kDa, de los cuales los de 55, 63 y 82, son detectados por sueros de ambos tipos de pacientes (asintomáticos y sintomáticos) y la proteína de 88 kDa sólo es detectada por el suero de pacientes sintomáticos, estos antígenos son utilizados en la clínica (Edson y cols, 1986).

Para la detección de coproantígenos, el antígeno de 66 ha sido utilizado en forma comercial (ELISA) (Rosoff Stibbs, 1986 y Rosoff y cols, 1989) por considerarlo un antígeno estable y detectable en heces.

C O N C L U S I O N E S

En conclusión se puede decir que el proceso de desenquistamiento en *Giardia lamblia* está regulado por calmodulina (CaM) ya que:

1.- La actividad de la fosfodiesterasa se incrementa en los quistes activados para desenquistamiento.

2.- Hay una redistribución de CaM durante el proceso de desenquistamiento.

3.- Los antagonistas de CaM inhiben el proceso de desenquistamiento.

4.- La CaM fue detectada tanto en quistes completos (QC) como en quistes inducidos (QI).

Asimismo se observó que existe muy probablemente un proceso de señalizaciones inducido en quistes inducidos (QI) ya que:

1.- Hay una fosforilación de proteínas durante el proceso de desenquistamiento.

2.- Se evidencia la presencia de proteínas de peso molecular aparente de 51 y 58 kDa, con anticuerpos anti-MPK II en quistes completos (QC) y quistes inducidos (QI).

Para la detección de coproantígenos, el antígeno de 66 ha sido utilizado en forma comercial (ELISA) (Rosoff Stibbs, 1986 y Rosoff y cols, 1989) por considerarlo un antígeno estable y detectable en heces.

C O N C L U S I O N E S

En conclusión se puede decir que el proceso de desenquistamiento en *Giardia lamblia* está regulado por calmodulina (CaM) ya que:

1.- La actividad de la fosfodiesterasa se incrementa en los quistes activados para desenquistamiento.

2.- Hay una redistribución de CaM durante el proceso de desenquistamiento.

3.- Los antagonistas de CaM inhiben el proceso de desenquistamiento.

4.- La CaM fue detectada tanto en quistes completos (QC) como en quistes inducidos (QI).

Asimismo se observó que existe muy probablemente un proceso de señalizaciones inducido en quistes inducidos (QI) ya que:

1.- Hay una fosforilación de proteínas durante el proceso de desenquistamiento.

2.- Se evidencia la presencia de proteínas de peso molecular aparente de 51 y 58 kDa, con anticuerpos anti-MPK II en quistes completos (QC) y quistes inducidos (QI).

B I B L I O G R A F I A

- Adam RD (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55:706-732.
- Aggarwal A, Merritt JW, Nash TE (1989) Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 32:39-48.
- Alonso GT. (1983) Frecuencia de las parasitosis intestinales en una escuela secundaria. *Sal Publ Mex* 25:389-392.
- Ajioka J, Swindle J. (1993) The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. *Mol Biochem Parasitol* 57:127-136.
- Arellano PM, Prieto AB. (1972) Frecuencia de parasitosis intestinales en guarderías infantiles del Distrito Federal. *Rev Mex Pediatr* 41: 173-180.
- Avron B, Bracha R, Deutsch MR, Mirelman D. (1983) *Entamoeba invadens* and *E. histolytica*: Separation and purification of precysts and cysts by centrifugation on discontinuous density gradients of percoll. *Exp Parasitol* 55:265-269.
- Baba ML, Goodman M, Berger-Cohn J, Demaille JG and Matsuda G. (1984) The early adaptative evolution of calmodulin. *Mol Biol Evol* 1:442-455.

- Bachs O, Agell N, Carofoli E. (1992) Ca^{2+} and calmodulin in nucleus. *Biochem Biophys Acta* 1113:259-270.
- Bachs O, Agell N, Carafoli E. (1994) Calmodulin and calmodulin-binding protein in the nucleus. *Cell Calcium* 16:289-296.
- Baitinger C, Alderton J, Poenic M, Schulman H, Steinhardt RA. (1990) Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope breakdown. *J Cell Biol* 111:1763-1773.
- Benaim G, Losada S, Gadelha FR, DoCampo R. (1991) A calmodulin-activated (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is involved in Ca^{2+} transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical J* 280:715-720.
- Bernal RR. (1990) Desenquistación y axenización de cepas mexicanas de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría en Ciencias Biomédicas, Area de Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM.
- Bernal RR. (1994) *Giardia lamblia* En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Ed. Giono CS, Escobar GA, Valdespino GJL Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) SSA pag. 465-475.
- Bingham AK, Meyer EA. (1979) *Giardia* encystation can be induced "in vitro" in acidic solutions. *Nature* 277:301-302.
- Bingham Ak, Jarrol EL, Meyer Ea, Radulescu S. (1979) *Giardia sp.*: Physical factors of encystation in vitro, and excystation vs. eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol* 47:284-291.

- Birrel GB, Hedberg KK, Habliston DL, Griffith OH. (1989)
Protein kinase C inhibitor H-7 alters the actin
cytoskeleton of cultured cells.
J Cell Physiol; 141:74-84.
- Boucher SEM, Gillin FD. (1990) Excystation of
in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts.
Infect Immun 58:3516-3522.
- Brady RC, Cabral FR, Schibler Mj and Dedman JR. (1985)
Cellular localization of calmodulin and calmodulin-
acceptor proteins. In: Calcium and Cell Physiology.
D Marmé Eds pp 140-147.
- Brockenhoff AE, Davis TN. (1992) Calmodulin concentrates at
regions of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*.
J Cell Biol 118:619-629.
- Bronstein JM, Faber DB, Wasterlain CG. (1993) Regulation of
type-II calmodulin kinase: functional implications.
Brain-Res-Brain-Res-Rev 18:135-147.
- Brostrom CO, Wolff DJ. (1981) Properties and functions of
calmodulin. Biochem Pharmacol 39:1395-1405.
- Buchel LA, Goreflot A, Chochillon C, Savel J, Gobert JG.
(1987) In vitro excystation of *Giardia* from humans: A
scanning electron microscopy study.
J Parasitol 73:487-493.
- Cázares TR, González OMA. (1985) Frecuencia de parasitosis
intestinales. Un estudio realizado en pacientes
afiliados a la Clínica Cuauhtémoc y Famosa.
Rev Mex Patol Clín 32:149-151.

- Chafouleas JG, Bolton WE, Hidaka H, Boyd AE, Means AR.
(1982) Calmodulin and the cell cycle: involvement in
regulation of cell-cycle progression. *Cell* **28**:41-50.
- Cheung WY, Lynch TJ, Wallace RW. (1978) An endogenous Ca^{2+} -
dependent activator protein of brain adenylate cyclase
and cyclic nucleotide phosphodiesterase.
Adv Cyclic Nucleotide Res **9**:233-251.
- Cheung WY. (1982) Calmodulin: an overview. *Fed Proc Fed Am
Soc Exp Biol* **41**:2253-2257.
- Coggins JR, Schaefer FW III. (1984) *Giardia muris*: Scanning
electron microscopy of in vitro excystation.
Exp Parasitol **57**:62-67.
- Coggins JR, Schaefer FW III. (1986) *Giardia muris*:
Ultrastructural analysis of in vitro excystation.
Exp Parasitol **61**:219-228.
- Cohen P. (1988) The calmodulin-dependent multiprotein
kinase. In: *Calmodulin. Molecular Aspects of Cellular
Regulation*. Cohen P & Klee CB Eds. Elsevier New York
pp 145-194.
- Crivici A, Ikura M. (1995) Molecular and structural basis
of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys,
Biomol, Struct* **24**:85-116.
- Dixon M. (1953) A nomogram for ammonium sulphate solutions.
Biochem **54**:457.
- Dutta GP. (1965a) Cytochemistry and fluorescence microscopy
of *Giardia intestinalis*. *Proc Natl Sci India*
31:151-165.

- Dutta GP. (1965b) Demonstration of neutral polysaccharides with fluorescence microscopy using acridine orange. *Nature* 205:712.
- Edson CM, Farthing MJG, Thorley-Lawson DA, Keusch GT. (1986) An 88,000 PM *Giardia lamblia* surface protein which is immunogenic in humans. *Infect Immun* 54:621-625.
- Einfield DA, Stibbs HH. (1984) Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 46:377-383.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Pawley. (1989) High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J Parasitol* 75, 787-797.
- Feely DE, Erlandsen SL, Chase DG. (1984) Structure of the trophozoite and cyst. In: *Giardia and Giardiasis. Biology, Pathogenesis and Epidemiology*. Erlandsen SL & Meyer EA Eds. New York pp 3-31.
- Feely DE. (1986) A simplified method for in vitro excystation of *Giardia muris*. *J Parasitol* 72:474-475.
- Feely DE, Dyer JK. (1987) Localization of acidic phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J Protozool* 34:80-83.
- Feely DE, Gardner MD, Hardin EL. (1991) Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J Parasitol* 77:441-448.

- Flynn RM, Jones ME, Lipmann F. (1954) A colorimetric determination of inorganic pyrophosphate. J Biol Chem 211:791-796.
- Friend DS. (1966) The fine structure of *Giardia muris*. J Cell Biol 29:317-332.
- Fuhrmann JA. (1990) Calcium binding proteins in *Schistosomes*. Parasitology Today 6:172-173.
- Garafalo RS, Gilligan DM, Satir BH. (1983) Calmodulin antagonists inhibit secretion in *Paramecium*. J Cell Biol 96:1072-1081.
- Gillin FD, Diamond LS. (1981b) *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Grow responses to reducing agents. Exp Parasitol 51:382-391.
- Gillin FD, Hagblom P, Harwood J, Aley SB, Reiner DS, McCaffery M, So M, Guiney DG. (1990) Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia* Proc Natl Acad Sci USA 87:4463-4467.
- Gillin FD, Reiner DS, McCaffery JM. (1996) Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Annu Rev Microbiol 50:679-705.
- Goldenring JR, Gonzalez B, McGuire JS, DeLorenzo RJ. (1983) Purification and characterization of a calmodulin-dependent kinase from rat brain cytosol able to phosphorylate tubulin and microtubule-associated proteins. J Biol Chem 258:12632-12640.

Goncalves MF, Zingales B, Colli W. (1980) cAMP phosphodiesterase and activador protein of mammalian cAMP phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*.
Mol Bioch Parasitol 1:107-118.

Gopalakrishna R, Anderson WB. (1982) Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharaffinity chromatography. Biochem Biophy Res Commun 104:830-836.

Gorts B, Retore P, Cadranel S, Hemelhof W, Rahman M, Butzler JP. (1984) Routine culture of *Giardia lamblia* trophozoites from human duodenal aspirates. Lancet 147:137-138.

Harlow E, Lane D. (1988) Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Eds. pag 92-116.

Havercroft JC, Huggins MC, Dunne DW, Taylor DW. (1990) Characterisation of Sm20, a 20 kilodalton calcium-binding protein of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 38:211-220.

Hegner RW. (1925) Excystation in *Giardia lamblia* from man. Am J Hyg 5:250-257.

Hegner RW. (1927a) Exystation in vitro of human intestinal protozoa. Science 65:577-578.

Hegner RW. (1927b) Excystation and infection in the rat with *Giardia lamblia* from man. Am J Hyg 7:433-441.

- Henry JB. (1990) Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Salvat Eds. pag 735-738.
- Herschman HR. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Ann Rev Biochem* 60:281-319.
- Hidaka H, Kobayashi R (1992) Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:377-397.
- Hiraga K, Suzuki K, Tsuchiya E, Miyakawa T. (1993) Identification and characterization of calmodulin-binding proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Act* 1171:25-30.
- Holberton DV. (1981) Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. *J Cell Sci* 47:167-185.
- Hulen D, Baron A, Salisbury J, Clarke M. (1991) Production and especificity of monoclonal antibodies against calmodulin from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motility Cytos* 18:113-122.
- Jackson SP. (1992) Regulating transcription factor activity by phosphorylation. *Trends Cell Biology* 2:104-108.
- Jamieson GA, Vanaman TC. (1979) Calcium-dependent affinity chromatography of calmodulin on an immobilized phenothiazine. *Biochem Biophys Res Commun* 90:1048-1056.

- Jarroll EL, Manning P, Lindmark DG, Coggins JR, Erlandsen SL. (1989) *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol* **32**:121-132.
- Jarroll EL, Manning P, Berrada A, Hare D, Lindmark DG. (1989) Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *J Protozool* **36**:190-197.
- Kawamoto S, Hidaka H. (1984) 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem Biophys Res Commun* **125**:258-264.
- Keister DB. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**:487-488.
- Klee CB. (1988) Interaction of calmodulin with Ca^{2+} and target protein. In: Calmodulin. Molecular aspects of cellular regulation. Cohen P, Klee CB Eds. pag 35-56.
- Kuo-Ping Huang. (1989) The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in Neuroscience* **12**:425-432.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Logan M, Zhou MM, Nettesheim DG, Meadows RP, Van Etten RL, Fesik SW. (1994) Solution structure of the low weight protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* **33**:11087-11096.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951)
Protein measurements with the folin phenol reagent.
J Biol Chem **193**:265-275.
- Luchtel DL, Lawrence WP, De Walle P. (1980) Electron
microscopy of *Giardia lamblia* cysts. App Envir
Microbiol **40**:821-832.
- Macechko PT, Steimle AP, Lindmark GD, Erlandsen LS, Jarrol
LE. (1992) Galactosamine-synthesizing enzymes are
induced when *Giardia* encyst. Mol Bioch Parasitol
56:301-310.
- Mannhol R, Timmerman H. (1992) Putative therapeutic
applications of calmodulin antagonist. Pham Weekbl Sci
14:161-166.
- Manning P, Erlandsen Sl, Jarrol EL. (1992) Carbohydrate and
aminoacid analyses of *Giardia muris* cysts. J Protozool
39:290-296.
- Matsumoto Y, Perry G, Scheibel LW, Aikawa M. (1987) Role of
calmodulin in *Plasmodium falciparum*: implications for
erythrocyte invasion by the merozoite. Eur J Cell Biol
45:36-43.
- Means AR, Tash JS, Chafouleas JG. (1982) Physiological
implications of the presence, distribution, and
regulation of calmodulin in eukaryotic cells.
Physiol Rev **62**:1-39.
- Meng TCh, Hetsko ML, Gillin FD. (1996) Inhibition of
Giardia lamblia excystation by antibodies against cyst
walls and by wheat germ agglutinin. Infection and
Immunity **64**:2151-2157.

- Meyer EA, Schaefer FW III. (1984) Models of excystation.
In: *Giardia and Giardiasis* SL Erlandsen and EA Meyer
Eds. pp 131-143.
- Moreno GM. (1990) Efecto de los antagonistas de calmodulina
sobre la secreción de colagenasa de *Entamoeba*
histolytica. Tesis de licenciatura en Biología
ENEP Iztacala, UNAM.
- Moore KJ, Labrecque S, Mattashewski G. (1993) Alteration of
Leishmania donovani infection levels by selective
impairment of macrophage signal transduction.
J Immunol 150:4457-4465.
- Moser D, Doenhoff MJ, Klinkert MQ. (1992) A stage-specific
calcium-binding protein expressed in eggs of
Schistosoma mansoni. *Mol Biochem Parasitol* 51:229-238.
- Muñoz ML, Weinbach EC, Weider SC, Claggett CE, Levenbook L.
(1987) *Giardia lamblia*: Detection and characterization
of calmodulin. *Exp Parasitol* 63:42-48.
- Muñoz ML, Claggett CE, Weinbach EC. (1988) Calcium
transport and catabolism of adenosine triphosphate
in the protozoan parasite *Giardia lamblia*.
Comp Biochem Physiol 91B:137-142.
- Muñoz ML, Moreno MA, Pérez-García J, Tovar, Hernández VI.
(1991) Possible role of calmodulin in the secretion of
Entamoeba histolytica electron-dense granules
containing collagenase. *Mol Microbiol* 5:1707-1714.

- Muñoz ML, O'Shea-Alvarez MS, Pérez-García J, Weinbach EC, Moreno MA, De la Torre M, Magos MA, Tovar R. (1992) Purification and biochemical properties of calmodulin in *Entamoeba histolytica* and its distribution during secretion of electron-dense granules. *Comp Biochem Physiol* 103B:517-521.
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. (1980) A Simplified ultrasensitive silver stain for detecting protein in polyacrylamide gel. *An Biochem* 105:361-363.
- Ohya Y, Anraka Y. (1989) A galactose-dependent cmd 1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae* involvement of calmodulin in nuclear division. *Curr Genet* 15:113-120.
- Ohya Y, Botstein D. (1994) Diverse essential functions revealed by complementing yeast calmodulin mutants. *Science* 263:963-966.
- Orr GA, Tanowitz HB, Wittner M. (1992) *Trypanosoma cruzi*: stage expression of calmodulin-binding proteins. *Exp Parasitology* 74:127-133.
- Paget TA, Kelly ML, Jarrol EL, Lindmark DG, Lloyd D. (1993) The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. *Mol Bioch Parasitology* 57:65-72.
- Parson M, Valentine M, Carter V. (1993) Protein kinase in divergent eukaryotes: identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2656-2660.
- Pearson RD, Marian AA, Marcus JW, Hall D, Hewlett EL. (1982) Lethal effects of phenothiazine neuroleptics on the pathogenic protozoa *Leishmania*. *Science Wash DC* 217:369-370.

- Perroncito E. (1887) Incapsulamento del *Megastoma intestinale*. Acad de Med 9 y 10:738.
- Ponce MM, Martínez GM, Alvarez-Chacón R. (1989) Excystation and culture of *Giardia* spp. from human source. Archiv Invest Med (Méx) 20:123-127.
- Pruschy M, Ju Y, spitz L, Carafali E, Goldfard DS. (1994) Facilitated nuclear transport of calmodulin in tissue culture cells. J Cell Biol 127:1527-1536.
- Ram D, Grossman Z, Markovics A, Avivi A, Ziv E, Lantner F, Schechter I. (1989) Rapid changes in the expression of a gene encoding a calcium-binding protein in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 34:167-176.
- Rasmusen CD, Means AR. (1992) Increased calmodulin affects cell morphology and mRNA levels of cytoskeletal protein genes. Cell Motility 21:45-57.
- Rauch AM, Rory Van MT, Bartlett AV, Pickering LK. (1990) Longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in a day care center population. Pediatr Infect Dis 9:186-189.
- Reiner DS, Douglas H, Gillin FD. (1989) Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. Infect and Immunity 57:963-968.
- Reiner DS, Mc Caffery M, Gillin FD. (1990) Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. European J Cell Biol 53:142-153.

- Robson KJH. (1993) Sequence diversity in the intron of the calmodulin gene from *Plasmodium falciparum*.
Mol Biochem Parasitology 60:1-8
- Rosoff JD, Stibbs HH. (1986) Physical and chemical characterization of a *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of giardiasis. J Clin Microbiol 24:1079-1083.
- Rosoff JD, Sanders CA, Sonnad SS, De Lay PR, Hadley WK, Vincenzi FF, Yajko DM, O'Hanley PDO. (1989) Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). J Clin Microbiol 27:1997-2002.
- Roufogalis BD. (1985) Calmodulin antagonists. In: Calcium and Cell Physiology. D Marmé Eds. Berlin pp 148-169.
- Ruben L, Edwuagu C, Patton CL. (1983) African trypanosomes contain calmodulin which is distinct from host calmodulin. Biochem Biophys Res Acta 758:104-113.
- Ruben L, Strickler JE, Egwnagu Ch, Patton CL. (1984) Structural and biological properties of calmodulin from african trypanosomes. In: Mol Biol Host-Parasite Interactions. Agabian N, Eisen H Eds. pp 267-278.
- Rudolph SA, Krueger BK. (1979) Endogenous protein phosphorylation and dephosphorylation.
Ad Cyclic Nucl Res 10:107-132.

- Salazar SPM, Alonso GT, Tay ZJ, Haro AI, Garcia YY, Ruiz HA, Bucio TM, Robert GL. (1988). Frecuencia de parasitosis intestinales en un grupo de escolares en Copilco el Alto y comparación de cinco métodos coproparasitológicos en relación a su capacidad diagnóstica. *Rev Mex Patol Clin* 35: 77-88.
- Salazar SPM, Majumder S, Kierszenbaum F. (1995) Regulatory effect of the level of free Ca^{2+} of the host cell on the capacity of *Trypanosoma cruzi* to invade and multiply intracellularly. *J Parasitol* 81:597-602.
- Schaefer FW III, Rice EW, Hoff JC. (1980) In vitro excystation of *Giardia muris* cysts. In: 55th Annual Meeting of the American Society of Parasitologists. Berkeley CA. Abstract 90.
- Schaefer FW III, Rice EW, Hoff JC. (1984) Factors promoting "in vitro" excystation of *Giardia muris* cysts. *Trans R Trop Med Hyg* 78:795-800.
- Scheibel LW, Colombani PM, Hess AD, Aikawa M, Atkinson CT, Milhous WK. (1987) Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): Implications for drug design. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7310-7314.
- Schulman H. (1984) Phosphorylation of microtubule-associated proteins by a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Cell Biol* 99:11-19.
- Schulman H. (1993) The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase. *Cell Biology* 5:247-253.

- Seger R, Krebs EG. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB* 9:726-735.
- Sharma RK, Mooibroek M, Wang JH. (1988) Calmodulin-stimulated cyclic phosphodiesterase isozymes. In: Calmodulin. Molecular aspects of cellular regulation Cohen P, Klee CB Eds. pp 265-292.
- Shea DK, Walsh CJ. (1987) mRNAs for α and β -tubulin and flagellar calmodulin are among those coordinately regulated when *Naegleria gruberi* amebae differentiate into flagellates. *J Cell Biol* 105:1303-1309.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571-582.
- Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. (1991) CREB: a Ca^{2+} regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinase. *Science* 252:1427-1430.
- Siddiqui AA, Podesta RB, Clarke MW. (1991) *Schistosoma mansoni*: Characterization and identification of calcium binding proteins associated with the apical plasma membrane and envelope. *Exp Parasitology* 72:63-68.
- Simon CE. (1921) *Giardia enterica*: A Parasitic intestinal flagellate of Man. *Amer J Hyg* 1:440-491.

- Sterling CR, Kutob RM, Gizinski MJ, Verastegui M, Stetzenbach L. (1988) *Giardia* detection using monoclonal antibodies recognizing determinants of *in vitro* derived cysts. In: *Advances in Giardia Research*. Ed. PM Willis & BR Hammond. University of Calgary Press. Calgary pp 219-222.
- Stewart TJ, Smith AL, Havercroft JC. (1992) Analysis of the complete sequence of a muscle calcium-binding protein of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 105:399-408.
- Stibbs HH, Riley ET, Stockard J, Riggs JL, Wallis PM, Issac-Renton J. (1988) Immunofluorescence differentiation between various animal and human source *Giardia* cysts using monoclonal antibodies. In: *Advances in Giardia Research*. Ed. PM Wallis & BR Hammond. University of Calgary Press. Calgary pp 159-163.
- Stoclet JC, Gerard D, Kithoffer MC, Lugnier C, Miller R and Shaeffer P. (1987) Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Progress Neurobiol* 29:321-364.
- Takuwa N, Zhou W, Takuwa Y. (1995) Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell Signaling* 7:93-104.
- Taylor GD, Wenman WM, Tyrrell DLJ. (1987) Human immune response to *Giardia lamblia* infection. *J Infect Dis* 155:137-140.
- Taylor SS, Adams JA. (1992) Protein kinases: coming of age. *Structural Biol* 2:743-748.

- Tellez-Iñón MT, Ulloa RM, Torruella M, Torres HN. (1985)
Calmodulin and Ca²⁺-dependent cyclic AMP
phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*.
Mol Biochem Parasitol 17:143-153.
- Teo TS, Wang JH. (1973) Mechanism of activation of a cyclic
adenosine 3': 5'-monophosphate phosphodiesterase from
bovine heart by calcium ions. Identification of the
protein activator as a Ca²⁺ binding protein. J Biol
Chem 248:5950-5955.
- Thompson DP, Chen GZ, Sample AK, Semeyn DR, Bennett JL.
(1986) Calmodulin: biochemical, physiological, and
morphological effects on *Schistosoma mansoni*.
Am J Physiol 251:1051-1058.
- Thompson RCA, Reynoldson JA. (1993) *Giardia* and Giardiasis.
Adv in Parasitol 32:71-160.
- Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbery AJ. (1993) *Giardia*
from molecules to disease and beyond.
Parasitology Today 9:313-315.
- Tolboom JM, Kabir H, Notatseli P, Anderson J, Arens T,
Fernandez J. (1987) Lactose malabsorption
and giardiasis in Basotho School Children.
Acta Paediatr Scand 76:60-65.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic
transfer of proteins from polyacrylamide gels to
nitrocellulose sheets: procedure and some
applications. Proc Natl Acad Sci 76:4350-4354.

- Trejo R, Mujica A. (1990) Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in Guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Develop* 26:366-376.
- Trewavas A, Gilroy S. (1991) Signal transduction in plant cells. *trends in Genetics* 7:356-361.
- Upton AL, Moss SE. (1992) Calcium-binding proteins: beyond hands and loops. *Trends Cell Biol* 2:175-176.
- Vega-Franco L, Meza AC, Lara AR, Hernández HG, Bernal RR. (1975) Absorción de la D-xilosa en las parasitosis intestinales. *Prens Med Mex* 40:197-201.
- Vega-Franco L, Alvarez EA, Romo QG, Bernal RR. (1982) Absorción de proteínas en niños con giardiasis. *Bol Med Hosp Infant Mex* 39:19-22.
- Velazquez W C. (1990) Cuantificación de quistes de *Giardia lamblia* en niños con y sin manifestaciones gastrointestinales. Tesis de licenciatura de Biología Facultad de Ciencias, UNAM.
- Vinayak JK, Dutt P, Puri M. (1991) An immunoenzymatic dot ELISA for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool eluates of clinical cases of giardiasis. *J Immunol Meth* 137:245-251.
- Vogel HJ. (1994) Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem Cell Biol* 72:357-376.

- Voller A, Bidwell D. (1986) Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. Rose NR, Friedman H, Fohey JL Eds. American Society for Microbiology pp 99.
- Wandosell F, Serrano L, Hernández MA, Avila J. (1986) Phosphorylation of tubulin by a calmodulin-dependent protein kinase. J Biol Chem **261**:10332-10339.
- Walter RD, Opperdoes FR. (1982) Subcellular distribution of adenylate cyclase, cyclic-AMP phosphodiesterase, protein kinases and phosphoprotein phosphatase in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol **6**:287-295.
- Ward HD, Alroy J, Lev BI, Keusch GT, Pereira MEA. (1985) Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. Infect Immunol **49**:629-634.
- Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C. (1997) A primitive enzyme for a primitive cell: The protease required for excystation of *Giardia*. Cell **89**:437-444.
- Waterson DM, Sharief F, Vanaman TC. (1980) The complete amino acid sequence of the Ca²⁺-dependent modulator protein (Calmodulin) of bovine brain. J Biol Chemistry **255**:962-971.
- Wright CD, Hoffman MD. (1987) Comparison of the roles of calmodulin and protein kinase C in activation of the human neutrophil respiratory burst. Biochem and Biophys Res Comm **142**:53-62.

Wylie DC, Vanamm TC. (1988) Structure and evolution of the calmodulin family of calcium regulatory proteins. In: Calmodulin. Molecular Aspects of Cellular Regulation. Ed. Cohen P & Klee CB pp 1-15.

Zhao Y, Pottuka S, Maurer P, Lindt M, Franklin RM, Kappes B. (1994) Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. Biochemistry 33:3714-3721.

ORIGINAL PAPER

Rosa María Bernal · Rosalinda Tovar · José I. Santos
María de Lourdes Muñoz

Possible role of calmodulin in excystation of *Giardia lamblia*

Received: 10 March 1998 / Accepted: 22 April 1998

Abstract The protozoan *Giardia lamblia* initiates infection when trophozoites emerge from a cyst in the hosts by the excystation process. Although this process is crucial to the initiation of infection by *G. lamblia*, little is known about its regulation. To study the possible involvement of calmodulin (CaM) in excystation we tested the effect of several CaM antagonists (TFP, W-7, and W-5) on this cellular function. Except for W-5 the rest of these compounds inhibited excystation. The protein kinase C inhibitor H-7 had no effect on excystation, suggesting that CaM antagonists acted by selectively inhibiting CaM. Furthermore, CaM was redistributed after the induction of excystation and there was an increase in its fluorescence and activity. These results suggest that a CaM-dependent process is involved in *G. lamblia* excystation.

Introduction

Intestinal parasites are responsible for widespread disease in humans and animals. One of the most important human intestinal parasites is *Giardia lamblia*, the causative agent of giardiasis (Farthing 1992). This parasite is cosmopolitan in its geographic distribution; various estimates indicate that it is an important cause of waterborne and restaurant-associated outbreaks of diarrhea, traveler's diarrhea, and diarrhea in child-care

facilities (Levine et al. 1990; Sullivan et al. 1990; Adam 1991; LeChevallier et al. 1991; Vidal et al. 1991; Quick et al. 1992). Indeed, *G. lamblia* has caused a number of waterborne outbreaks of diarrhea in the United States, and it is one of the endemic intestinal parasites most frequently identified in Mexican children (Bernal 1994).

The *Giardia* life cycle includes a cyst, which is absolutely required for survival outside the host as well as for initiation of new infections (Rendtorff 1954). This form protects the enclosed trophozoite from desiccation and harsh chemical environments. The success of this adaptation is underscored by the observation that *G. lamblia* is now the most common intestinal parasite of humans worldwide (Adam 1991; Kappus et al. 1994). Excystation of fecal cysts in vitro has been accomplished by mimicking of passage through the acid-filled stomach and upper small intestine; thus, some of the differentiation process has begun to help clarify the mechanisms of excystation (Bingham and Meyer 1979; Rice and Shaefer 1981). Since very little is known about the regulation mechanisms, we have begun to study the role of calmodulin (CaM) in this process. CaM is a ubiquitous protein found in all eukaryotic cells (Crivici and Ikura 1995; Vogel and Zhang 1995), including the parasites *G. lamblia* (Muñoz et al. 1987) and *Entamoeba histolytica* (Muñoz et al. 1991, 1992). This activator is widely recognized as the common primary intracellular receptor for calcium in most eukaryotic cells (Crivici and Ikura 1995; Vogel and Zhang 1995). The protein can interact strongly with up to four calcium ions per mole, and the calcium-CaM complexes subsequently bind to and regulate a large number of functions. Among such functions are cell secretion, microtubule-related motility, cyclic nucleotide metabolism, and activation of enzymes such as protein kinase, myosin light-chain kinase, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-kinase, Ca^{2+} - Mg^{2+} -adenosine triphosphatase (ATPase), phospholipase A_2 , and methyl transferase, among others (Crivici and Ikura 1995). In view of the manifold physiological effects of Ca^{2+} -CaM complexes, it was of interest to us to ascertain if CaM participated in excystation of *G. lamblia*.

R. Tovar · M. de Lourdes Muñoz (✉)
Department of Genetics and Molecular Biology,
Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508,
Col. San Pedro Zacatenco,
México, D.F., C.P. 07300
e-mail: lmunoz@lambda.gene.cinvestav.mx. Tel.: 747-7000 ext. 5380.
Fax: 747-7100

R. M. Bernal · J. I. Santos
Laboratory of Parasitology, Hospital Infantil de México Federico
Gómez, México, D. F., México

Materials and methods

Cysts

Giardia lamblia cysts present in fecal specimens ($1-5 \times 10^6$ ml) obtained from human donors (children) from the Hospital Infantil de Mexico were separated from the fecal material by emulsification of feces in a solution of Triton X-100 at 0.2% and were filtered through four layers of cheesecloth. The filtrate was centrifuged at 700 g for 5 min and the sediment was suspended in an equal amount of water. The cysts were separated from the pellet by flotation on 0.85 M sucrose in a modification of the procedure described by Sheffield and Bjorvatn (1977). The suspension was diluted 10-fold with water and then centrifuged at 400 g for 3 min. Finally, a gradient of Percoll (30% and 50%; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) was run by centrifugation at 600 g at 4 °C for 15 min (Avron et al. 1983); the 30–40% Percoll layer contained mostly mature cysts. For elimination of contamination by different microorganisms the cysts were washed two times with a washing solution consisting of 0.14 M NaCl containing penicillin (10^3 units/ml), streptomycin (1 mg/ml), gentamicin (0.1 mg/ml), and amphotericin B (0.05 mg/ml; Sanfer Laboratory, Mexico). Cysts were stored in this washing solution at 4 °C for a maximum of 21 days. Cyst densities were determined by hemacytometer counts.

Excystation of human cysts

The excystation procedure comprised basically two steps: a low-pH induction step and an excystation step in culture medium (Keister 1983) as described by Rice and Schaefer (1981). The procedure was conducted with a suspension of 3×10^6 cysts/ml. In the induction step the cysts (3.0×10^6) suspended in 1 ml of washing solution containing antibiotics (see above) were incubated in a total volume of 10 ml by the addition of 9.0 ml of aqueous solution of 0.1 M hydrochloric acid, (pH 1.6). The tube was immediately capped tightly and the contents were blended and incubated for 40 min at 37 °C. After this incubation the cysts were sedimented by centrifugation at 600 g for 2 min and the supernatant was discarded and washed two times with the washing solution (see above).

For study of the role of CaM during the induction step, 3×10^3 cysts suspended in 0.14 M NaCl were preincubated for 16 h at 4 °C with different concentrations of the CaM antagonists purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). The CaM antagonists, trifluoperazine (TFP) and *N*-(6-aminohexyl)chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7), were added before the addition of the acidic solution. *N*-(6-aminohexyl)-naphthalenesulfonamide (W-5; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA), which is similar in structure to W-7 but does not bind to CaM, was used as a control. Finally, after being washed with the washing solution (see above), cysts were treated at low pH as mentioned above.

The excystation step was initiated by suspension of the cysts (3×10^3) in 0.2 ml of TYI-S-33 medium (Diamond et al. 1978) as modified by Keister (1983) for either 1 or 24 h at 37 °C in multiwell tissue-culture plates (model 76-003-05, 96 flat-bottomed wells, diameter 0.6 cm; Linbro Chemical Co.). The number of emerging cysts was determined by microscopic counting. The viability was determined by eosin exclusion (Bingham and Meyer 1979).

To determine the role of CaM in the second step of excystation we tested the effect of CaM antagonists (TFP, W-7, and W-5) by incubating 3×10^3 induced cysts in each well of multiwell tissue-culture plates (96 flat-bottomed wells) in 0.2 ml TYI-S-33 medium (Diamond et al. 1978) containing the CaM antagonists according to Keister (1983). Because CaM antagonists may also inhibit protein kinases when used at high concentrations, the protein kinase inhibitor H-7 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd, Tokyo, Japan) was tested as a control in both steps of excystation. After 1 and 24 h, respectively, cysts and trophozoites were counted and the percentage of excystation was calculated. The viability was also evaluated in these preparations as mentioned above.

Anti-CaM antibodies

Bovine testis CaM was purified according to the procedure described by Gopalokrishna and Anderson (1982). Antibodies were raised in rabbits by injection of 1 mg of CaM as described by Van Eldik and Watterson (1981). IgG from immune rabbits was prepared by ammonium sulfate precipitation as described elsewhere (Andrew and Titus 1992).

Electrophoretic blotting procedures

Proteins from sonicated cysts (20 µg of protein/well) were first separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; Laemmli 1970); this was followed by electrophoretic transfer of proteins to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-rad, Hercules, Calif., USA; Towbin et al. 1979). Afterward the PVDF membrane was incubated with glutaraldehyde (0.2%) and washed with phosphate-buffered saline (PBS). The blots were incubated with a 1:800 dilution of rabbit anti-bovine testis CaM (1 mg/ml, prepared in the laboratory). The second antibody, goat anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Calif., USA) conjugated to a phosphatase (0.75 mg/ml), was diluted 1:2000. Finally, immunodetection was performed as described previously (Leary et al. 1983).

Immunofluorescence

Normal cysts and induced cysts were fixed for 15 min in a solution containing formaldehyde (1.85%) and glutaraldehyde (0.125%) at 37 °C, then washed with PBS and incubated with 1 M glycine for 15 min at 37 °C. The cysts were then permeabilized with 0.3% (w/v) Triton X-100 in 15 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.18 M NaCl and washed three times with the same solution. Cysts were then incubated with 0.0025% Evans blue for 20 min at 37 °C and finally incubated overnight at 4 °C with anti-CaM antibody obtained as described above (1 mg/ml, diluted 1:10). After being washed with PBS, cysts were incubated first with goat anti-rabbit IgG conjugated to biotin (0.6 mg/ml, diluted 1:200; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Calif., USA) and then with fluorescein-streptavidin (0.75 mg/ml, diluted 1:100; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Calif., USA). Excess streptavidin was removed by washing of samples three times with PBS. Cysts were then mounted in 50% glycerol and examined by fluorescence microscopy.

Cyst extracts

For the determination of the phosphodiesterase activation by CaM, supernatants of crude extracts were prepared as follows: washed normal cysts or induced cysts, suspended in a buffer solution consisting of 40 mM TRIS-HCl, 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 100 mM NaCl containing proteinase inhibitors, 20 mM parahydroximercuribenzoate (pHMB), and 10 mM *N*-ethylmaleimide (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) at pH 7.4 were disrupted at 4 mA for 30 s in a Bronson Sonicator Model B-30 (Bronson Instruments) and then centrifuged at 800 g for 10 min. The supernatant obtained from this centrifugation was used to test CaM activity.

Ca²⁺-CaM-dependent cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase activation by cyst extracts

Heart cyclic adenosine monophosphate (cAMP) phosphodiesterase was assayed at 30 °C for 30 min using the one-stage procedure described by Teo and Wang (1973). The procedure involved the conversion of 5'-AMP, the product of the cAMP phosphodiesterase reaction, to adenosine and inorganic phosphate by 5'-nucleotidase. The reaction mixture in a volume of 0.9 ml contained, in

addition to activator-deficient beef-heart cAMP phosphodiesterase and the protein activator, 25 mM TRIS, 25 mM imidazole, 0.1 M CaCl₂, 3 mM magnesium acetate, 1.2 mM cAMP, and 0.2 unit of 5'-nucleotidase. Inorganic orthophosphate was measured in supernatant fluid after centrifugation using the colorimetric method described by Flynn et al. (1954); 1 unit of cAMP phosphodiesterase activity is equivalent to the amount of enzyme that, when maximally activated by both the protein activator and Ca²⁺, hydrolyzes 1 μmol of cAMP min at 30 °C under standard conditions. CaM was assayed by measurement of the extent of stimulation of a fixed amount of activator-deficient beef-heart cAMP phosphodiesterase; 1 unit of protein activator activity is defined as the amount that is required to give 50% stimulation of 0.012 unit of cAMP phosphodiesterase.

Results

Immunodetection of CaM in *Giardia lamblia* cysts

CaM from cysts was detected using antibodies raised against bovine testis CaM by Western-blot assays (Fig. 1) and immunofluorescence (Figs. 2, 3). Results of Western-blot analysis showed that antibodies against bovine testis CaM recognized two polypeptides with

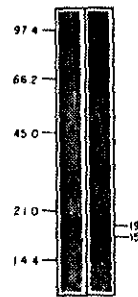
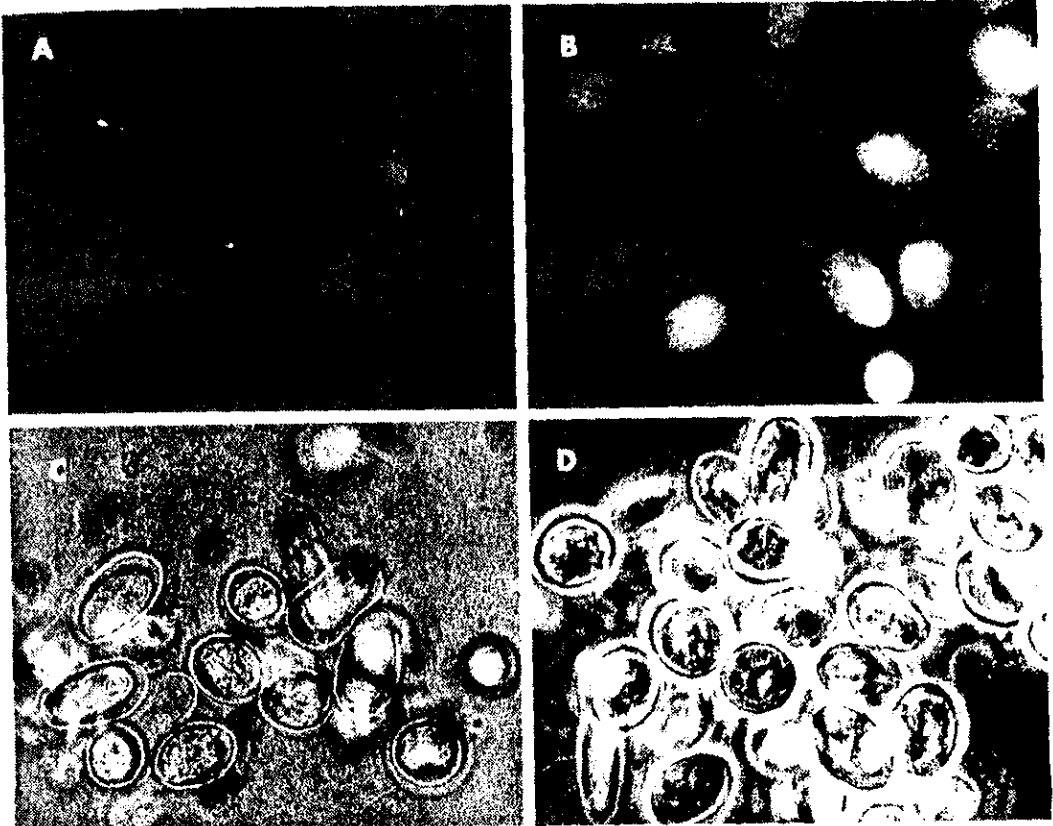


Fig. 1 Immunoblots of extracts from *Giardia lamblia* cysts. Extracts from cysts (lane A) and induced cysts (lane B) were subjected to SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose, and probed with rabbit anti-bovine CaM. Molecular-mass markers are shown in kDa. The control, incubated with normal immunoglobulin, did not show any reaction

Fig. 2A-D Immunofluorescence microscopy of *G. lamblia* cysts with anti-CaM antibody. A Purified cysts stained with anti-CaM. B HCl-induced cysts stained with anti-CaM. The control, incubated with normal immunoglobulin, showed a negative stain



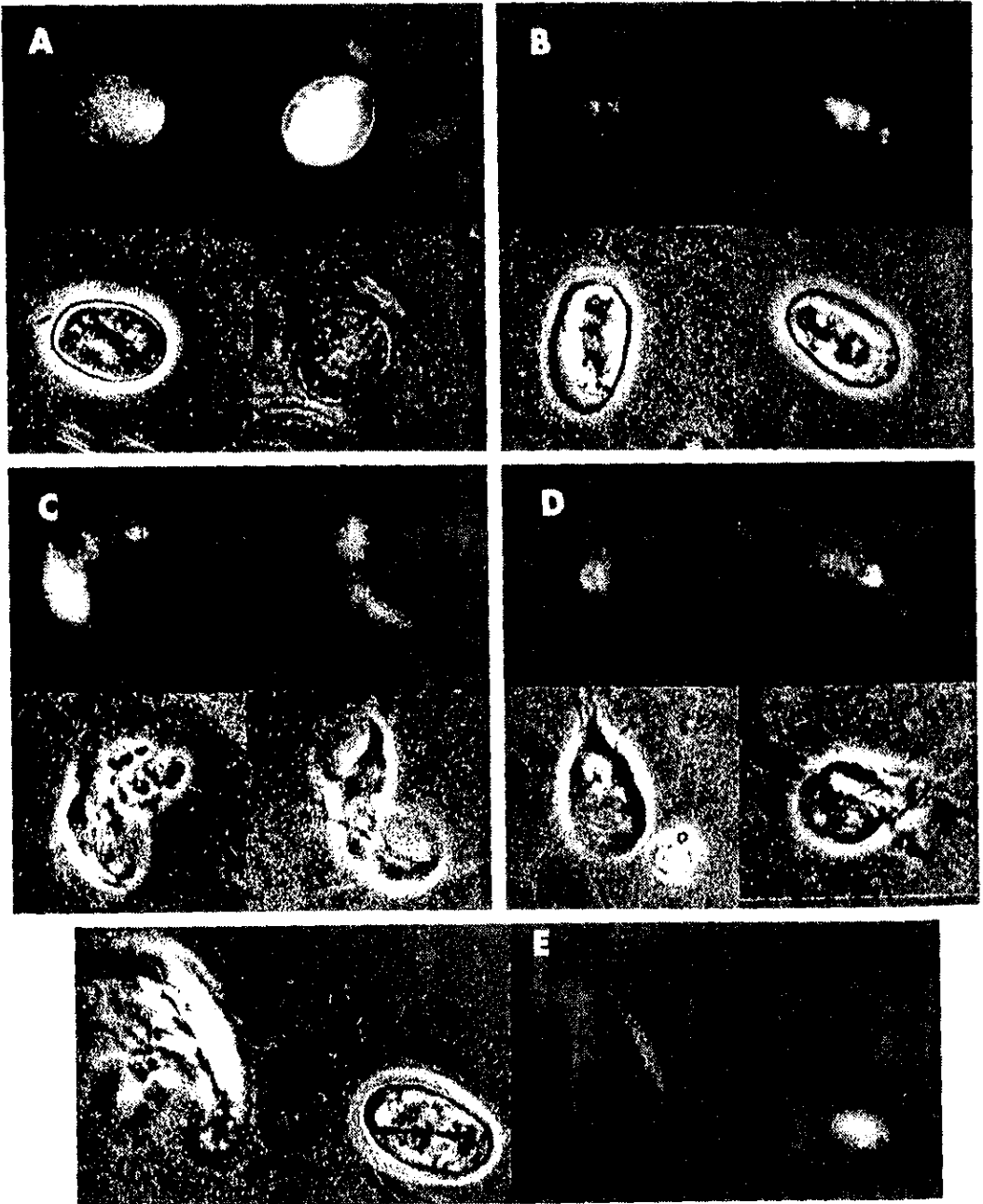


Fig. 3A-E Immunofluorescence microscopy of *G. lamblia* cysts stained with anti-CaM antibodies during excystation. Cysts were incubated with HCl, washed, and fixed after 0.5 min (A), 1 min (B), 3 min (C, D), and 5 min (E) and were then stained with rabbit anti-CaM from bovine testis as mentioned in Materials and methods. The control, incubated with normal immunoglobulin, showed no stain

Table 1 Activity of cyclic nucleotide phosphodiesterase induced by CaM of *Giardia lamblia*

Sample	U CaM/mg protein ^a
Normal cysts	3125
Cysts with induction	4000

^a 1 activator unit is the amount of CaM that is necessary to raise the activity of Ca²⁺-dependent CaM-free heart phosphodiesterase to 50% of its maximal activation at CaM saturation (Sharma and Wang 1979); *P* < 0.05

apparent molecular weights of 15 and 19 kDa (Fig. 1). Immunofluorescence assays using these specific antibodies showed that CaM was localized within the cyst wall and diffuse in the cytoplasm (Fig. 2A). After activation with HCl the fluorescence increased (Fig. 2B) and CaM was redistributed to the wall, the plasma membrane and the cytoplasm (Figs. 2B, 3A). It is also noteworthy that the activation of cysts was heterogeneous since the quantity of fluorescence varied in a group of cysts stained at the same time (Fig. 2B). During excystation the fluorescence was also observed as small spots in both the periphery and the cytoplasm of the cysts (Figs. 2B, 3A, 3B). The fluorescence in emerging trophozoites was localized in the membrane, cytoplasm, and flagella (Fig. 3C, 3D). After the trophozoite had emerged, fluorescence was also detectable in the cyst walls (Fig. 3E). CaM was then assayed in supernatants of *G. lamblia* cysts, induced cysts, and emerging trophozoites by its ability to activate the Ca²⁺-CaM-dependent cAMP phosphodiesterase from bovine-heart CaM. The supernatant fractions of *G. lamblia* cysts stimulated this enzymatic activity up to 3125 U of CaM/mg of protein (Table 1). An increase of about 28% (4000 U CaM/mg protein) in specific activity was detected in the supernatant of cysts induced for excystation, which was apparently reflected by an increase in the fluorescence of induced cysts (Fig. 2B).

Effect of TFP, W-7, and H-7 on *G. lamblia* excystation

To determine if CaM played a role in the induction step of excystation we tested the effect of CaM antagonists. Preincubation of human cysts in TFP and W-7 at different concentrations before the induction step inhibited excystation. TFP at a concentration of 15 μ M inhibited excystation by up to about 52% (Fig. 4A). The viability of cysts and emerging trophozoites was 90%. The effect of W-7 was similar at a concentration of 20 μ M (Fig. 3B). The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀ values) are shown in Table 2. The low-affinity antagonist W-5 and the protein kinase C (PKC) inhibitor showed no effect in the induction step of the excystation process.

For investigation of the role of CaM in the second step of excystation, after the induction step the cysts were incubated in TYI-S-33 medium containing the CaM antagonists as mentioned in Materials and meth-

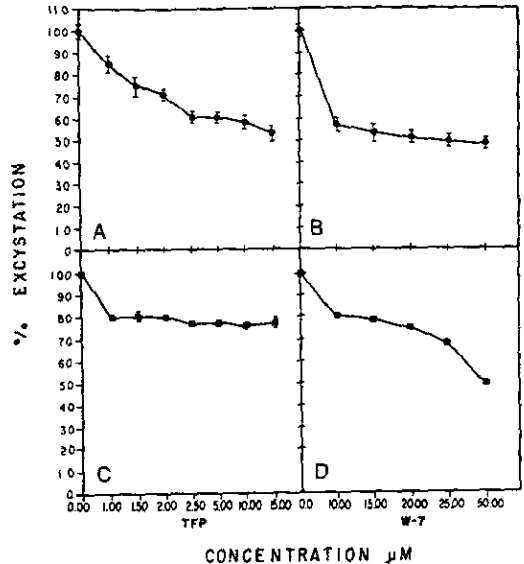


Fig. 4A-D Effect of calmodulin antagonists on *G. lamblia* excystation. To test the effect of CaM antagonists during the induction step we incubated cysts with different concentrations of the CaM antagonists (A, B) and then with the induction solution. Finally, the excystation step was initiated as mentioned in Materials and methods, and the effect of CaM antagonists (TFP, W-7) in the second step of excystation was tested by incubation of induced cysts in TYI-S-33 medium containing TFP and W-7 (C, D) as described in Materials and methods. After 1 and 24 h, respectively, cysts and trophozoites were counted and the percentage of excystation and viability was calculated. All experiments were repeated at least 3 times in triplicate. Standard deviations are represented by bars

Table 2 Effects of CaM inhibitors on *G. lamblia* excystation (NE No effect)

Compound	Stage I	Stage II	Viability (%)
	IC ₅₀ (μ M) ^a		
	CaM		
Trifluoperazine	15	—	90
W-7	20	50	95
W-5	NE	NE	95
H-7	NE	NE	95

^a Concentration of compound giving 50% inhibition of *G. lamblia* excystation. These values represent the average of at least four independent experiments

ods. TFP, a potent inhibitor of CaM, partially inhibited the emergence of trophozoites. A maximal inhibition of 20% was observed with 10 μ M of this compound (Fig. 4C). W-7, another CaM inhibitor, also produced inhibition rates of 35% and 50% at concentrations of 25 and 50 μ M, respectively, versus the emergence of trophozoites (Fig. 4D). This compound showed no toxicity toward cysts or trophozoites of *G. lamblia*. The IC₅₀

values are shown in Table 2. W-5, a low-affinity antagonist, did not show any inhibitory effect.

H-7 was included since CaM antagonists may also inhibit PKC. In these assays there was no detectable inhibition of the emergence of trophozoites when induced cysts were incubated with these compounds. Cell viability was also unaffected.

Discussion

The etiological agent *Giardia lamblia* is an intestinal protozoan that is transmitted by the cyst stage. Excystation is a complex process that occurs in response to relatively rapid and extreme changes in temperature and pH. Upon their ingestion by a new host, cysts pass from a cold, hypotonic environment with a pH of between 5 and 6 in water to the warm stomach with a pH of 2-4, and then to the small intestine with a pH of 7-8. Bingham and Meyer (1979) showed that exposure to acid was the key stimulus for the excystation of fecal cysts in vitro. Subsequently, Rice and Schaefer (1981) demonstrated that the efficiency of excystation of fecal cysts in vitro was increased by exposure to reducing environment and proteases, and Gillin et al. (1987) extended those findings to in-vitro-derived cysts. We obtained an excystation rate of 90-95% by incubation of cysts exclusively with HCl solution in the low-pH induction step as mentioned in Materials and methods. Apparently, exposure to acid was the only key stimulus for the excystation of fecal cysts in vitro, as Bingham and Meyer (1979) had reported. More recently, Ward et al. (1997) have shown that excystation is blocked by specific cysteine protease inhibitors, and they suggest that a cysteine protease that is contained in cytoplasmic vesicles and needed for excystation is released just prior to excystation. This suggests that the addition of proteases, although not strictly required, could facilitate excystation, as has been proposed by other authors (Rice and Schaefer 1981).

Meng et al. (1996) have suggested the possibility that because antibodies against purified cyst walls (PCW) and anti-wheat germ agglutinin (WGA) inhibit excystation by more than 90%, antibodies might interfere with stage II stimuli by binding to sialic-acid-containing glycoproteins. Apparently the binding of anti-PCW or WGA prevented the normal breakdown of the *G. lamblia* cyst wall during excystation. These authors demonstrated the importance of cyst wall components for excystation and provided initial insights into the physiological responses of *Giardia* cysts to specific environmental stimuli. However, doubts remain about the regulatory mechanisms by which excystation occurs. Furthermore, there is no insight regarding the role of CaM in any excystation process.

The approach taken to discern the role of CaM in the regulation of *G. lamblia* excystation was to test (a) the effect of CaM antagonists, (b) the immunocytochemical localization of CaM itself, and (c) CaM activity through the activation of brain phosphodiesterase by the parasite

protein in excystation stages I and II. In addition, this protein was detected by immunoblotting, which revealed apparent molecular weights of 19 and 15 kDa. This CaM is therefore similar to that previously reported in this parasite (Muñoz et al. 1987) and is similar to that found in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica* (Muñoz et al. 1991, 1992), in *Plasmodium falciparum* (Scheibel et al. 1987), and in mammalian cells (Crivici and Ikura 1995; Vogel and Zhang 1995).

In addition, the immunofluorescence studies showed that CaM localization changed during the different stages of excystation, which correlates with a redistribution of this activator in different cellular processes for other protozoan cells such as *E. histolytica* during the induction of secretion (Muñoz et al. 1992). This suggests that CaM participates in the excystation process.

The results of the present study indicate that excystation stage I was inhibited in intact trophozoites by the CaM antagonists TFP and W-7. The most effective inhibitor was TFP, which exhibited an IC₅₀ value of 2.5 μM. This IC₅₀ value was similar to that reported in in vitro studies (Nishikawa et al. 1980; Weiss et al. 1982; Roufagalas 1985). Although it has been reported that TFP is highly toxic to other eukaryotic cells, in *G. lamblia* cysts the viability was kept around 90%. A less toxic compound highly specific for CaM was W-7, which exhibited an IC₅₀ value of 20 μM. W-5, which is a less effective CaM inhibitor, did not inhibit excystation. This study is important, since drugs that inhibit excystation could impair this cellular process and, therefore, block infection.

The CaM antagonist concentrations required to inhibit excystation in this parasite were lower than those reported to inhibit PKC (Mori et al. 1980; Schatzman et al. 1983; Wise and Kuo 1983). Therefore, as we expected, H-7, a potent inhibitor of PKC, had no effect on excystation. Thus, we conclude that CaM antagonists inhibited this cellular activity through a Ca²⁺-/CaM-dependent process.

In summary, the results presented in this paper support the notion that CaM is involved in the mechanism of excystation in *G. lamblia*. Further research is required to determine the exact mechanisms of inhibition.

Acknowledgements We thank Dr. Pradeep Das and Dr. Juan Curi for critically reading this manuscript and the staff of the Electron Microscopy Unit, CINVESTAV, IPN, for allowing us to use their facilities.

References

- Adam RD (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55: 706-732
- Andrew SM, Titus JA (1992) Purification of immunoglobulin G. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (eds) *Current protocols in immunology*. Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore. P 2.7.1
- Avron B, Bracha R, Deutsch MR, Mirelman D (1983) *Entamoeba invadens* and *E. histolytica*: separation and purification of pre-

- cysts and excystation by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. *Exp Parasitol* 55: 265-269
- Bernal RR (1994) *Giardia lamblia* In: Giono CS, Escobar GA, Valdespino GIL (eds) diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), SS-Mexico. pp 465-475
- Bingham AK, Meyer EA (1979) *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. *Nature* 277: 301-302
- Crivici A, Ikura M (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24: 85-110
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *E. histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431-432
- Farthing MSG (1992) New perspectives in giardiasis. *S Med Microbiol* 37: 1-2
- Flynn RM, Jones ME, Lipmann F (1954) A colorimetric determination of organic pyrophosphate. *J Biol Chem* 211: 791-796
- Gillin FD, Reimer DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A, Sauch JF (1987) Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* 235: 1040-1043
- Gopalokrishna R, Anderson WB (1982) Ca^{2+} -induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 104: 830-836
- Kappus KD, Lundgren RG Jr, Juranek DD, Roberts JM, Spencer HC (1994) Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. *Am J Trop Med Hyg* 50: 705-713
- Keister DB (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 487-488
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Leary JJ, Brigati DJ, Ward D (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bioblots. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4045-4049
- LeChevallier MW, Norton WD, Lee RG (1991) *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. *Appl Environ Microbiol* 57: 2617-2621
- Levine WC, Stenphenson WT, Craun GF (1990) Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. *Mortal Morbid Weekly Rep CDC Surveill Summ* 39: 1-13
- Meng TC, Hetsko ML, Gillin FD (1996) Inhibition of *Giardia lamblia* excystation by antibodies against cyst walls and by wheat germ agglutinin. *Infect Immun* 64: 2151-2157
- Mori T, Yoshimi T, Minakuchi R, Yu B, Nishizuka Y (1980) Inhibitory action of chlorpromazine, dibucaine and other phospholipid-interacting drugs on calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 255: 8378-8380
- Muñoz ML, Weinbach EC, Wieder SC, Claggett CE, Levenbook L (1987) *Giardia lamblia*: detection and characterization of calmodulin. *Exp Parasitol* 63: 42-48
- Muñoz ML, Moreno MA, Pérez-García JN, Tovar GR, Hernandez YI (1991) Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules containing collagenase. *Mol Microbiol* 103B: 517-521
- Muñoz ML, O'Shea-Alvarez MS, Pérez-García J, Weinbach EC, Moreno MA, De la Torre M, Magos MA, Tovar R (1992) Purification and biochemical properties of calmodulin in *Entamoeba histolytica* and its distribution during secretion of electron-dense granules. *Comp Biochem Physiol [B]* 103: 517-521
- Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H (1980) Ca^{2+} -calmodulin dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature* 287: 863-865
- Quick R, Paugh K, Addiss D, Kobayash J, Baron R (1992) Restaurant-associated outbreak of giardiasis. *J Infect Dis* 166: 673-676
- Rendtorff RC (1954) The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 59: 209-220
- Rice EW, Shaefer FW III (1981) Improved in vitro excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J Clin Microbiol* 14: 709-710
- Roufagaldis BD (1985) Calmodulin antagonism. In: Marmé D (ed) Calcium and cell physiology. Springer Berlin Heidelberg New York. pp 148-169
- Schatzman RC, Raynor RL, Kuo JF (1983) *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7), a calmodulin antagonist, also inhibits phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 755: 144-147
- Scheffeld HG, Bjorvatn B (1977) Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am J Trop Med Hyg* 26: 23-30
- Scheibel LW, Colombani PM, Hess AD, Aikawa M, Atkinson CT, Milhous WK (1987) Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): implications for drug dosing. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7310-7314
- Sullivan PB, Marsh MN, Phillips MB, Dewit O, Neale G, Cevallos AM, Yanson P, Farthing MJG (1990) Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. *Arch Dis Child* 65: 304-306
- Teo TS, Wang JH (1973) Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca^{2+} binding protein. *J Biol Chem* 248: 5950-5955
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure of some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
- Van Eldik LJ, Watterson DM (1981) Reproducible production of antiserum against vertebrate calmodulin and determination of the immunoreactive site. *J Biol Chem* 256: 4205-4210
- Vidal MFC, Gilman RH, Ungar BLP, Verastegui MR, Benel AD, Marquis G, Penny M, Lanata C, Mirana E (1991) Detection of *Giardia lamblia* antigen in children living in a Peruvian periurban shantytown (Pueblo Joven). *J Clin Microbiol* 29: 636-637
- Vogel HJ, Zhang M (1995) Protein engineering and NMR studies of calmodulin. *Mol Cell Biochem* 149-150: 3-15
- Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH (1997) A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* 89: 437-444
- Weiss B, Prozialeck WC, Wallace TL (1982) Interaction of drugs with calmodulin: biochemical, pharmacological and clinical implications. *Biochem Pharmacol* 31: 2217-2226
- Wise BC, Kuo JF (1983) Modes of inhibition by acylcarbitines, adriamycin and trifluoperazine of cardiac phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase. *Biochem Pharmacol* 32: 1259-1265