



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
PROTEASAS DE TROFOZOÍTOS DE
Giardia lamblia QUE INTERVIENEN EN EL
PROCESO DE ADHESIÓN A CÉLULAS
EPITELIALES”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR(A) EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. EN C. GUADALUPE BEATRÍZ RODRÍGUEZ FUENTES

DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Una parte de este trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular, así como en el laboratorio 7 del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN.

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó una beca con el registro número 69143 durante el período de 1999-2002.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto número 4315P-M9608 y el Programa de Apoyo a la Investigación Médica de la Coordinación de Investigación Médica, IMSS con el proyecto número CGPI 200 50123.

Este trabajo recibió la asesoría de los miembros del Comité Tutorial formado por la Dra. Lilián Yépez Mulia, la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres y la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Porque con sus enseñanzas, apoyo y amor incondicionales han contribuído en gran medida en todos mis logros.

A Víctor:

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

A mis amigos:

A todos ustedes que siempre han puesto un granito de arena en mi desarrollo como persona y como profesionalista.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilián Yépez Mulia. Mi reconocimiento y gratitud por haberme permitido colaborar con su grupo de investigación.

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres. Con mi admiración y respeto por la gran cantidad de conocimientos y sugerencias aportadas a este trabajo, además del gran interés mostrado en el desarrollo del mismo. De manera especial, agradezco el haberme permitido realizar parte de los experimentos en su laboratorio e integrarme a su grupo de trabajo, lo que fue muy importante en mi formación. Así como también por el invaluable apoyo moral que siempre me dió.

Al Dr. Raúl Arguello García. Por el gran interés mostrado para la realización y revisión de este trabajo, quien con su gran experiencia en este campo aportó valiosas sugerencias. Así como por el apoyo académico que nunca escatimó.

A la Bióloga Rocío Fonseca. Por su constante ayuda, experiencia y sugerencias aportadas desde mi maestría hasta el doctorado. Porque siempre me escuchaste y me apoyaste en momentos difíciles, así como por los gratos momentos que compartimos.

A la Dra. Rossana Arroyo. Con mi gratitud y admiración por su apoyo en mi estancia en su laboratorio, por hacerme sentir parte de su grupo de trabajo y por todos los conocimientos legados.

A la Dra. Bertha Espinoza. Por el interés mostrado para la revisión de esta tesis y los comentarios aportados a ésta.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS UTILIZADAS	V
RELACIÓN DE FIGURAS	VI
ABSTRACT	VIII
RESUMEN	X
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Taxonomía, sistemática y nomenclatura	1
I.2 Ciclo de vida	4
I.3 Secuencias génicas y patrón de isoenzimas	8
I.4 Epidemiología	9
I.5 Características clínicas	10
I.6 Mecanismos de patogenia de la giardiosis	13
I.7 Actividad de proteinasas en protozoarios y su relación con la patogenicidad	22
Parásitos:	
- <i>Entamoeba histolytica</i>	23
- <i>Plasmodium falciparum</i>	25
- <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
- <i>Trichomonas vaginalis</i>	27
I.8 Antecedentes directos: proteinasas de <i>Giardia lamblia</i>	34
I.9 Justificación	39

II. OBJETIVOS

-General	41
-Particulares	41

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Parásitos y células epiteliales	42
2.- Cultivo de trofozoitos de <i>G.lamblia</i>	42
3.- Obtención del lisado total de trofozoitos	42
4.- Cultivo de células epiteliales IEC6	43
5.- Ensayo de adhesión de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> a células epiteliales IEC6	44
6.- Análisis de las proteinasas secretadas por trofozoitos de <i>G. lamblia</i>	45
7.- Evaluación de la interacción de los trofozoitos con las células IEC6 mediante microscopía electrónica de barrido	47
8.- Fijación de células IEC6	47
9.- Ensayos de ligandos-proteinasa	48
10.- Determinación de la actividad proteolítica	49
11.- Análisis electroforético del eluído del ensayo de ligandos-proteinasa y del LT de <i>G. lamblia</i> en dos dimensiones	50
12.- Caracterización de CP90	
-pH óptimo	51

-Temperatura óptima	52
-Tipo de proteinasa	52
-Activadores	53
13.- Producción del suero anti-CP90	53
14.- Obtención de las fracciones celulares de los trofozoitos de <i>G. lamblia</i>	53
15.- Inmunoelectrotransferencia (IET)	54
16.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	55

IV. RESULTADOS

- Análisis electroforético de los sobrenadantes de cultivo de trofozoitos solos o en interacción con IEC6	56
- Evaluación del daño celular después de la interacción parásito-célula	62
- Caracterización de CP90	66
- Efecto de activadores sobre la actividad de CP90	68
- pH y temperatura óptima para la actividad de CP90	70
- Degradación de diferentes sustratos por CP90	74
- Determinación del pI de CP90 por análisis bidimensional	75
- Análisis de las fracciones celulares enriquecidas de trofozoitos de <i>G. lamblia</i>	76
- Inmunoelectrotransferencia de las diferentes fracciones celulares enriquecidas	77
- Ensayos de inmunofluorescencia indirecta	78

V. DISCUSIÓN	80
VI. CONCLUSIONES	90
VII. BIBLIOGRAFÍA	92
APÉNDICES A-J	110

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ASF	Amortiguador Salino de Fosfatos
DOC	Desoxicolato de sodio
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
E64	Trans epoxi succinil L leucil amido-4-guanidino butano
TPCK	L-1-cloro-3(4 tosilamido)4-fenil-2-butanona-tosil-fenilalanil clorometilcetona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IEC6	Células epiteliales de íleon de rata
D-MEM-Hyb	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco para hibridomas
PPO	2,5 difeniloxazol
POPOP	p-bis 2-(5 feniloxazolil) benceno
cpm	cuentas por minuto
μC	micro-Curie
SN	sobrenadante
UI	Unidades Internacionales
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IET	Inmunoelectrotransferencia

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Análisis electroforético de los sobrenadantes de cultivo de trofozoitos solos o en interacción con células IEC6	66
Figura 2. Análisis electroforético de los sobrenadantes de cultivo de trofozoitos solos o en interacción con células IEC6 con tinción con plata	70
Figura 3. Análisis por microscopía electrónica de barrido de la interacción de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> con las células IEC6	72
Figura 4. Estandarización de las condiciones experimentales del ensayo de ligandos-proteinasas	74
Figura 5. Efecto de los inhibidores de proteinasas en la actividad de la proteinasas de 90 kDa	76
Figura 6. Efecto de los activadores en la actividad de CP90	78
Figura 7. Actividad de CP90 a diferentes valores de pH	80
Figura 8. Actividad de CP90 a diferentes valores de temperatura	81
Figuras 9 y 10. Densitometría de la actividad de CP90 a diferentes valores de pH y temperatura	82

Figura 11. Degradación de diferentes sustratos por CP90	83
Figura 12. Análisis electroforético co-polimerizado con gelatina en dos dimensiones de las proteinasas presentes en el LT de <i>G. lamblia</i>	84
Figura 13. Análisis de las fracciones celulares enriquecidas de <i>G. lamblia</i>	85
Figura 14. Localización de CP90 en las diferentes fracciones celulares obtenidas de trofozoitos de <i>G. lamblia</i>	87
Figura 15. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta	88

RESUMEN

Giardiosis es la enfermedad ocasionada por el parásito protozoario *G. lamblia* (Sin. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) a partir de la ingestión de quistes, la mayoría de las veces por contaminación fecal o por alimentos y agua contaminados. Después del desenquistamiento en el intestino delgado superior, los trofozoitos se adhieren a las células epiteliales intestinales, lo que representa el primer paso en la patogénesis de la enfermedad. En estudios previos de nuestro grupo se demostró que proteinasas del tipo cisteína, serina y metalo son importantes en la adhesión de este parásito a la línea celular epitelial IEC6, por lo que nos interesó analizar la presencia de proteinasas en sobrenadantes de trofozoitos de la cepa WB cultivados solos o en interacción con las células IEC6, así como su participación en el proceso de adhesión. Asimismo, se investigó el reconocimiento de la superficie de las células IEC6 por las proteinasas del parásito mediante el empleo de un ensayo de ligandos-proteínasa y se caracterizó a las proteinasas involucrada(s). Posteriormente, se realizó la localización de estas por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

En este estudio demostramos la secreción de proteinasas del tipo cisteína. Cuando se analizaron los sobrenadantes de los trofozoitos cultivados solos se detectaron 7 bandas con actividad proteolítica y pesos moleculares de 198, 135, 120, 107, 73, 30 y 22 kDa y cuando los trofozoitos se pusieron en interacción con la línea celular IEC6 y se analizó el sobrenadante, se observó un aumento en la actividad proteolítica de las bandas de 135, 107, 30 y 22 kDa. Con el empleo de inhibidores específicos de proteinasas como E64 y TPCK, se observó efecto tanto en la secreción de proteinasas como en la inhibición de la adhesión del parásito a las células epiteliales (36 y 45% respectivamente).

Asimismo, se demostró la unión a la superficie de las células IEC6 de una proteínasa de 90 kDa, la cual está presente en el lisado total de los trofozoitos de *G. lamblia*. Esta proteínasa fue caracterizada y se observó que es del tipo cisteína (CP90), con un pI de 6.8 y su actividad es óptima a pH 5.5 y 37°C. De manera interesante también se observó que CP90 degrada sustratos diferentes a gelatina, como IgG e IgA. Se determinó su localización en la superficie del trofozoito por IFI.

Los resultados obtenidos en este estudio proveen evidencias importantes relacionadas con la participación de cisteína proteinasas secretadas por los trofozoitos de la cepa WB en el proceso de adhesión a las células epiteliales, sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el mecanismo de acción de CP90.

ABSTRACT

Giardiasis caused by the protozoan parasite *G.lamblia* (Sin. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*), results from the ingestion of cysts, most commonly from faecal contamination of water and food. After excystation in the upper small intestine, trophozoites adhere to epithelial intestinal cells, representing the first step in the pathogenesis of the disease. Previous studies from our group have shown that cysteine, serine and metallo proteinases from this parasite are important in the adhesion of the parasite to the epithelial cell line IEC6. It was our interest to analyze the presence of proteinases in the supernatants of trophozoites cultured alone or after interaction with IEC6 cells and their participation in the adhesion process. In addition, the recognition of IEC6 cell surface by parasite proteinases was investigated by using the ligand-proteinase assay and their characterization was also performed. Finally, the localization of the parasite proteinase(s) was evaluated by indirect immunofluorescence (IFI).

In this study demonstrated the secretion of cysteine proteinases by the parasite. When the supernatant of trophozoites cultured alone was analyzed, 7 bands of proteolytic activity were detected with MW of 198, 135, 120, 107, 73, 30 and 22 kDa and a major increase in proteolytic activity of molecules of 135, 107, 30 and 22 kDa was observed when the trophozoites were co-cultured with IEC6 cells. Besides, the use of specific proteinase inhibitors such as E64 and TPCK had effect on the proteinase secretion and also reduced the adhesion of the parasite to epithelial cells (36 and 45% respectively).

The recognition of the IEC6 cell surface by a 90 kDa proteinase present in total lysates of *G. lamblia* trophozoites was also demonstrated. It was determined that this proteinase is a cysteine proteinase (CP90), with a pI of 6.8 and optimal activity at 37°C and pH 5.5. Interestingly, CP90 degraded substrates other than gelatin, such as IgG and IgA. CP90 was determined by IFI to be localized on the trophozoite surface.

The results obtained in this study provide important evidence related to the participation of cysteine proteinases secreted by WB trophozoites in their adhesion to epithelial cells.

Indeed, the localization of CP90 on the parasite surface, strongly suggests the involvement of this molecule in the parasite-host relationship. Further studies are needed in order to determine the mechanism in which CP90 is participating in this process

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto gastrointestinal por protozoarios ocurren a nivel mundial y tienen tasas de morbilidad y mortalidad significativas. A este respecto, la giardiosis, cuyo agente etiológico es *Giardia lamblia* (sinónimo: *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) es una parasitosis cosmopolita, prevalente en países en desarrollo y que desde 1960 se ha asociado a brotes epidémicos importantes en países altamente industrializados, entre ellos Nueva Zelanda y Estados Unidos de Norteamérica. *G. lamblia* es un parásito no invasivo el cual ocasiona a nivel mundial un estimado de 10^8 casos por año (Lane y Lloyd, 2002). Entre las infecciones intestinales producidas por protozoarios, la giardiosis se encuentra entre las más comunes en humanos en todo el mundo. El hábitat natural de *G. lamblia* es la parte alta del intestino delgado (duodeno y yeyuno). La infección puede cursar de manera asintomática o bien producir alteraciones como diarrea aguda o crónica y ocasionalmente síndrome de absorción intestinal deficiente (Farthing, 1992).

I. 1. Taxonomía, Sistemática y Nomenclatura

En la mayor parte de los reportes que existen en la literatura desde el punto de vista evolutivo (Adam, 2001; Lloyd y Wallis, 2001; Lloyd y Harris, 2002) colocan a *G. lamblia* en la base del árbol eucariótico. Representa un género que divergió tempranamente de los procariontes y aunque se clasifica como eucarionte, comparte más características con organismos procariontes que con eucariontes (Peattie, 1990). Este microorganismo microaerofílico, carece tanto de mitocondrias como de hidrogenosomas y muestra muchas características metabólicas que lo hacen similar

a las bacterias (Brown y cols., 1998). Se han clonado varios genes de *Giardia* que codifican para diversas proteínas comúnmente localizadas en mitocondria en otros organismos, indicando que pudo haber ocurrido la evolución a partir de un ancestro que sí tenía mitocondria (Embley y Hirt, 1998). Así, *Giardia* pudo haber evolucionado como un parásito a partir de un flagelado aeróbico de vida libre típico (Fenchel y Finlay, 1995). Su metabolismo y secuencias génicas han conducido a considerarlo como un eucariote simple, anaeróbico, primitivo y tempranamente divergente, localizándolo filogenéticamente en la base del árbol evolutivo de los organismos eucariotes. *Giardia* es un ejemplo de un parásito sorprendentemente bien adaptado a las características del hospedero y a los retos cambiantes que frecuentemente encontramos en el microambiente del intestino. Kunstler en 1882 propuso el nombre del género *Giardia*, y en 1888 Blanchard llama al género *lamblia*, en honor al médico checo Wilem Lambl quien redescubre y redescrive a estos organismos en 1859. Un cuarto de siglo más tarde, se reconoció que los nombres del género *Giardia* y *lamblia* eran sinónimos.

La clasificación más reciente considera el género *Giardia* incluido en el subfilum Sarcomastigófora (locomoción por flagelos, pseudópodos o ambos), en la superclase Mastigófora (locomoción por flagelos), clase Zoomastigófora (cloroplastos ausentes) y orden Diplomonadida (organelos duplicados). Hasta la mitad de este siglo fue común asignar nombres de especies al género *Giardia* en base a la especificidad del hospedero y a las dimensiones corporales de éste. Usando este criterio se han descrito más de 40 especies de *Giardia*. Sin embargo, cuando el organismo se separa del hospedero no puede ser diferenciado de otros de diferentes especies animales.

Debido a esta limitante, Filice (1952) propuso una nomenclatura basada en la diferenciación en la forma de los cuerpos medios y en el tamaño y forma del cuerpo. Aplicando este criterio, Filice propuso reducir el número total de especies de *Giardia* a tres, de la siguiente manera:

a) *Giardia agilis* que tiene el cuerpo medio en forma de gota paralelo al eje axial del cuerpo. Los trofozoitos son angostos y largos (20 x 4.5 μm) y se ha descrito únicamente en anfibios y peces.

b) *Giardia muris* con dos cuerpos medios redondos y pequeños en el centro del trofozoito; esta especie ha sido encontrada en roedores, aves y reptiles.

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

Cabe mencionar que existen otras clasificaciones de las especies de *Giardia* en función de otras características morfológicas. Así, existe la especie *G. psittaci* clasificada en función de la forma del cuerpo medio (garra de martillo) y por la presencia de un flanco ventrolateral incompleto así como la carencia de surco ventral. Por otro lado, la especie que se aisló de la garza azul y que es morfológicamente distinta a otras especies, se le llamó *G. ardae*, su cuerpo medio

es similar al de *G. muris* y *G. lamblia*, pero por su disco ventrolateral y la presencia de un solo flagelo caudal es más parecida a *G. muris* (Adam, 1991)

I.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Giardia* incluye dos formas: el trofozoito y el quiste, se inicia cuando (Figura 1) un hospedero adecuado ingiere el quiste, el cual es inducido a desenquistarse por diversos factores, entre ellos la acidez estomacal y la alcalinidad asociada a secreciones con proteasas pancreáticas. El desenquistamiento usualmente se lleva a cabo en el intestino delgado (duodeno) del hospedero y termina cuando se da la ruptura del quiste y emerge una masa tetranucleada de protoplasma denominada exquizoito (Svard y cols., 2003). Esta última se diferencia en dos trofozoitos que se adhieren al epitelio del intestino delgado por medio del disco adhesivo. El proceso de fisión binaria se lleva a cabo repetidamente y cuando los trofozoitos se desprenden del epitelio intestinal, éstos se transforman en quiste. Durante el proceso de enquistamiento, el trofozoito que conserva dos núcleos llega a ser un quiste binucleado. Posteriormente cada uno de estos dos núcleos lleva a cabo una única división, dando como resultado un quiste tetranucleado, el cual es excretado y el ciclo de vida se completa cuando un nuevo hospedador ingiere los quistes infectantes.

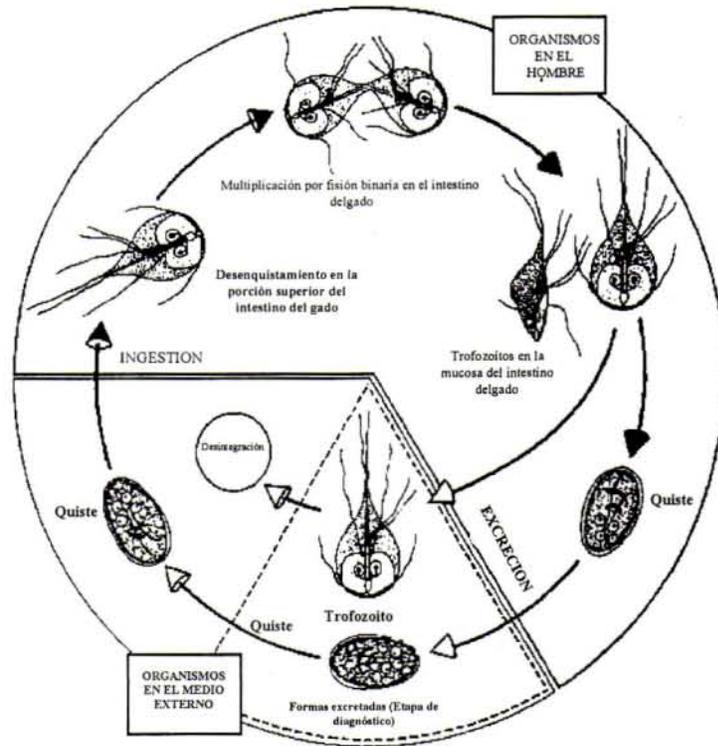


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*

Tomada de Meyer, 1974

Los **trofozoitos**, que infectan el intestino delgado proximal y ocasionan la enfermedad, son de forma piriforme de simetría bilateral y miden 12-14 μm de largo y entre 5-8 μm de ancho. Presentan una superficie dorsal convexa y una superficie ventral plana en donde se encuentra el disco ventral característico de este género. Sus movimientos en espiral dan la impresión de "una hoja de árbol que cae". Cada uno de los trofozoitos presenta dos núcleos, cuatro pares de flagelos, los que se encuentran dispuestos en simetría bilateral, y dependiendo de la especie, se encuentran uno o dos cuerpos medios, carecen de mitocondrias. El retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi son aparentes durante la secreción de

componentes requerida para el enquistamiento (Reiner y cols., 1990). El citoesqueleto está constituido por tubulina, actina, proteínas motoras, proteínas asociadas y otras clases de proteínas. Recientemente se demostró la presencia de un nuevo grupo de vesículas unidas a la membrana en trofozoitos de *G. lamblia*. Éstas son diferentes a las ya descritas del sistema endomembranoso de *Giardia*, así como del retículo endoplásmico, de las vesículas periféricas tipo lisosoma y las vesículas específicas de enquistamiento que aparecen durante la diferenciación de los trofozoitos a quistes. Las nuevas vesículas miden entre 100-150 nm de diámetro por lo que son más pequeñas que las vesículas periféricas y de enquistamiento. Se sugiere que podrían ser una fuente de nuevas membranas para el crecimiento de la célula, o servir como vesículas secretorias, es probable que sean porciones o fracciones especializadas del RE que lleven a cabo algunas funciones del Golgi o bien que sean estructuras que contienen enzimas, ya que *Giardia* carece de mitocondrias. En este sentido, *Giardia* presenta enzimas que maduran en un organelo unido a membrana determinado mitosoma (Tovar y cols., 2003) como por ejemplo la NADH peroxidasa y la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa, en un organelo unido a membrana no identificado.

Los trofozoitos de *Giardia* se alimentan por pinocitosis y se han descrito numerosas vacuolas digestivas cerca de la superficie dorsal (Adam, 2001).

El **quiste** es la forma de resistencia e infectiva del parásito; presenta una morfología elíptica y mide aproximadamente de 6 a 10 μm de largo. Éste se encuentra rodeado por una pared de 0.3 μm de grosor, la cual está compuesta de una membrana interna y una capa filamentosa externa (Erlandsen y cols., 1990). La

pared filamentosa externa está compuesta de proteínas (37%) y filamentos de hidratos de carbono (63%) (Jarroll y cols., 1989; Gerwing y cols., 2002). Dependiendo de la madurez del quiste, se pueden identificar de dos a cuatro núcleos e internamente se encuentran axonemas flagelares, ribosomas y fragmentos del disco ventral. Luján y cols. (1995a) identificaron una proteína de la pared del quiste de 26 kDa, denominada CWP1. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales contra antígenos de la pared del quiste, se clonó también el gen que codifica para otra proteína de la pared del quiste, CWP2 (Mowatt y cols., 1996). Se observó que durante el proceso de enquistamiento la expresión de ambas proteínas tiene cinéticas idénticas que se combinan para formar un complejo estable el cual es localizado en las vesículas específicas de enquistamiento antes de su incorporación en la pared del quiste. Ambas proteínas contienen 5 copias en tandem de repeticiones de 24 residuos ricas en leucina, las cuales están implicadas en las interacciones proteína-proteína.

Por otro lado, Touz y cols. (2002) demostraron que la expresión de CWP1 y CWP2 se induce coordinadamente y ambas se concentran dentro de vesículas secretorias específicas de enquistamiento antes de su polimerización extracelular, aun cuando hay similitud entre ellas en el extremo amino terminal. Además, CWP2 incluye una extensión de 121 a.a en el extremo carboxilo. En este estudio se demostró que esta extensión, rica en residuos básicos, es separada de CWP2 por una cisteína-proteinasa intracelular antes de la formación de la pared del quiste. Esta proteinasa es inducida durante el enquistamiento como las CWP's. Asimismo se reportó que inhibidores específicos de proteasas impiden la liberación de los materiales de la

pared del quiste, evitando la formación de la pared quística. Por otro lado se reportó la purificación, clonación y caracterización de dicha cisteína-proteinasa específica de enquistamiento responsable del proceso proteolítico de CPW2 que es homóloga a la catepsina C lisosomal. Esta proteinasa posee características únicas como son el dominio transmembranal y una cola citoplásmica corta, características que hacen que esta proteinasa se convierta en la catepsina C más divergente reportada a la fecha, lo cual abre la posibilidad a una gama de estudios con respecto a la formación de la pared del quiste en *Giardia*.

Macechko y cols. (1992) describieron una vía relacionada con el proceso de enquistamiento para la biosíntesis de N-acetilgalactosamina (NacGal), incluyendo la epimerización de UDP-N acetilglucosamina a UDP-N acetilgalactosamina, la cual es una reacción reversible. Más recientemente, Das y Gillin (1996) reportaron actividades de dos transferasas en trofozoitos enquistados y basados en estos estudios, se sugirió que la N-acetilgalactosamina *in vivo* se encuentra estrechamente relacionada con los componentes estructurales de la pared fibrosa del quiste, mientras que la N-acetilglucosamina (NacGlu) puede encontrarse principalmente adicionada a proteínas. NacGal es crucial para la consistencia y grosor de la pared del quiste, mientras que los componentes que son glucoproteicos y que contienen NacGlu son requeridos para transducción de señales necesarias para el proceso de desenquistamiento.

I.3. Secuencias génicas y patrón de isoenzimas

El análisis de diversos aislados establecidos en cultivo en varios laboratorios alrededor del mundo han revelado como mínimo 2 grupos o subespecies dentro de *Giardia sp* en base a las diferencias en la unidad de repetición de ADN_r, en los patrones de movilidad electroforética de isoenzimas, variaciones en la secuencia de enzimas estructurales, variabilidad antigénica, huellas de ADN y cariotipos electroforéticos o perfiles de cromosomas. Y aún más recientemente, un aislado de *G. lamblia* se estableció en cultivo a partir de un ave la cual murió por una infección ocasionada por el parásito. Este último aislado, el cual infecta ratones de manera crónica, imitando el síndrome visto en niños es clasificado como un aislado humano. Actualmente no hay marcadores genéticos o sistemas de clasificación disponibles para distinguir cepas patogénicas, resistentes a drogas o potencialmente zoonóticas derivadas de muestras ambientales o clínicas.

I.4. Epidemiología

La giardiosis presenta una distribución cosmopolita con 10-15% de la población mundial infectada en promedio. Alrededor de 200 millones de personas en Latinoamérica, Asia y África sufren la enfermedad sintomática, estimándose cerca de 500,000 casos nuevos cada año. Su mayor prevalencia se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta el 30% de los adultos. Es más frecuente en niños, personas internadas en orfanatos o cárceles, homosexuales y viajeros. En México, las cifras de infección por este parásito son del orden del 23%, del cual el 27.2% corresponde a niños menores de 5 años y el 13% de entre 6 y 11 años de edad (Ramírez y cols., 2002).

Giardia lamblia es uno de los principales agentes causales de diarrea en el hombre y afecta principalmente a la población infantil. A pesar de ser endémica a nivel mundial y de haber sido descrita desde el siglo pasado, no había sido estudiada hasta hace tres décadas, en virtud de que existía la noción de que este parásito no era un microorganismo de importancia médica. El creciente interés en el estudio de la giardiosis se explica, entre otras razones, por ser una de las causas más frecuentes de brotes diarreicos a nivel mundial. Se ha estimado que hay cerca de 1000 millones de casos de giardiosis, lo cual da como resultado 2.5 millones de muertes anualmente por enfermedad diarreica (Parasitic Diseases Programme WHO, 1998).

La transmisión directa persona-persona y oro-fecal son mecanismos por los cuales la enfermedad es transmitida. De manera indirecta, la giardiosis es diseminada a través del agua y los alimentos (Craun, 1986; Petersen y cols., 1988). Otra forma de transmisión directa es la que se presenta entre homosexuales (Schmerin y cols., 1978). La sobrevivencia de quistes en alimentos y la contribución de ésta como una fuente activa no han sido bien caracterizadas. Sin embargo, se han reportado un gran número de casos en donde se ha identificado a los alimentos como la fuente de brotes severos de giardiosis (Adam, 1991).

I.5. Características clínicas

Las manifestaciones clínicas de esta infección son influidas por varios factores como son: duración de la infección, estado inmunológico y nutricional del hospedero, tamaño del inóculo y factores propios del parásito. Dependiendo de éstos, la

infección puede cursar de manera asintomática o sintomática. La resistencia del quiste a la deshidratación, el ciclo de vida directo de este parásito, la presencia de individuos asintomáticos que liberan quistes y factores socio-culturales, son algunos de los elementos que se deben de tomar en cuenta en la epidemiología de esta enfermedad. En la giardiosis se presenta un espectro clínico amplio que varía en intensidad, desde individuos asintomáticos, pasando por infecciones agudas y subagudas generalmente limitadas en la mayoría de los pacientes, hasta síndromes persistentes de mala absorción, diarrea crónica y pérdida de peso (Guimaraes y cols., 2003).

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

La giardiosis sintomática ha sido bien caracterizada en viajeros que se trasladan de lugares de baja a alta endemicidad. Los síntomas aparecen generalmente entre el día 3 y el 20 de la llegada y en la gran mayoría de los casos la enfermedad se auto-limita en un período de entre 2 a 4 semanas. Sin embargo, en más del 25% de los viajeros infectados los síntomas persisten durante 7 semanas o más. El síntoma predominante de este tipo de infección es diarrea, la cual al inicio, generalmente es de tipo acuosa. Además presentan otros síntomas tales como náuseas, dolor abdominal, anorexia y con frecuencia pérdida de peso.

Aunque la infección es auto-limitante en la mayoría de los individuos sanos, una proporción (30-50%) de los casos de giardiosis aguda declina en crónica, con la presencia de diarrea crónica, frecuentemente con las características de esteatorrea. La presencia del parásito en el intestino produce el síndrome de absorción intestinal deficiente como consecuencia del daño directo de los trofozoitos sobre las microvellosidades de los enterocitos, provoca atrofia de las mismas y la subsecuente disminución del área de absorción (Chávez y cols., 1986; Ferguson y cols., 1990). En estudios *in vitro*, se han reportado cambios en las monocapas de las líneas celulares epiteliales como MDCK o SCBN después de la adhesión de los trofozoitos. Estos cambios incluyen un aumento en la resistencia trans-epitelial, inducción de atrofia de las microvellosidades, rompimiento de las uniones estrechas por alteración en la distribución de proteínas como ZO-1 y la inducción de apoptosis por una vía dependiente de caspasa 3, cambios que al parecer son dependientes de la cepa empleada (Chávez y cols., 1995; Buret y cols., 2002; Chin y cols., 2002). Cerca del 50% de pacientes sintomáticos presentan evidencia

bioquímica de absorción deficiente de grasas, vitamina A y B₁₂. Asimismo, existe evidencia de anemia macrocítica severa debida a deficiencia de folato y absorción deficiente de hidratos de carbono sugerida por la absorción reducida de D-xilosa. De la misma manera, se ha reconocido que en la giardiosis hay deficiencia secundaria de lactasa con mal absorción de lactosa como consecuencia, que lleva varias semanas recuperarse después de la expulsión del parásito. Se ha descrito también un aumento en la pérdida de proteína proveniente del intestino y asociación con hipoalbuminemia (Mantovani y cols., 1989; Korman y cols., 1990).

En lo que respecta a la respuesta inmune en la giardiosis juega un papel en la patología de la mucosa intestinal. En la inmunidad adquirida, ambos tipos de inmunidad (celular y humoral) son importantes, así como las subpoblaciones de las células T, macrófagos y neutrófilos, componentes accesorios del sistema inmune como el complemento juegan también un papel, con respecto a citocinas, poco se sabe, ya que se han realizado pocos estudios. Cabe mencionar que la interleucina (IL-6) es un potente cofactor de IL-1 en la síntesis de IgM1 y de IL-5 en la síntesis de IgA (Kunimoto y cols., 1989).

I.6 Mecanismos de patogenia de la giardiosis

En la patogénesis de la giardiosis se han postulado varios mecanismos de daño al epitelio intestinal del hospedero, los cuales intentan explicar la producción de las manifestaciones de la enfermedad. Entre los mecanismos propuestos destaca la acción directa de los trofozoitos sobre las microvellosidades de los enterocitos (Gillon y cols., 1984; Chávez y cols., 1986). Mediante microscopía electrónica de

barrido se ha demostrado que los trofozoitos dejan marcas de profundidad variable que son la imagen especular del disco ventral sobre las microvellosidades de las células epiteliales y no en las células M intercaladas entre las mismas (Guillon y cols., 1984; Chávez y cols., 1986). Asimismo, se ha descrito la reducción y distorsión del borde de las microvellosidades, aumento en el índice mitótico de las células de las criptas epiteliales, interferencia en el metabolismo de sales y ácidos biliares (Halliday y cols., 1988) y secreción de moco por las células caliciformes por estímulo de citocinas liberadas por células T reactivas a antígenos de *Giardia* (Guillon y cols., 1982). La severidad de estas lesiones parece ser mayor en las regiones más próximas a la luz intestinal y estar alternadas con regiones en las cuales la mucosa no tiene daño. De la misma manera, se ha propuesto la producción de sustancias con acción tóxica sobre las células epiteliales (efecto citopático) (Radulescu y cols., 1980). A este respecto, en un estudio realizado por Chávez y cols. (1995) se determinó que el medio D-MEM condicionado previamente por el cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* durante 24-48 h, altera los potenciales de membrana de células MDCK.

Recientemente, Buret y cols. (2002) evaluaron los efectos de *G. lamblia* en la permeabilidad epitelial y en las uniones estrechas ZO-1 (zonula occludens). Los resultados obtenidos mostraron que la exposición de monocapas epiteliales de intestino delgado humano no transformadas (SCBN) al contacto con *G. lamblia* aumenta significativamente la permeabilidad trans-epitelial y rompe las uniones estrechas ZO-1. El pretratamiento de las monocapas en la región apical con factor de crecimiento epidérmico (EGF) desaparece por completo las alteraciones inducidas

por el parásito, así como también inhibe la colonización del epitelio del intestino delgado humano por *G. lamblia*. El aumento en la permeabilidad trans-epitelial permite la penetración con detrimento de los contenidos lumbinales en los tejidos sub-epiteliales y este mecanismo ha sido implicado en la patofisiología de una infinidad de desórdenes gastrointestinales.

Por otro lado, en esta parasitosis se presenta infiltración de leucocitos polimorfonucleares y mononucleares en la sub-mucosa del epitelio intestinal y la intensidad de la respuesta celular parece ser proporcional a la intensidad de la infección. Asimismo, se ha descrito un aumento en el número de linfocitos intra-epiteliales y su posible relación con la respuesta inflamatoria. En este estudio es necesario considerar la existencia de cepas del parásito que presentan diferentes grados de patogenicidad (Nash y cols., 1987), heterogeneidad en patrones de isoenzimas de diversos aislados de *Giardia lamblia* (Meloni y cols., 1988; Cedillo-Rivera y cols., 1989), en antígenos de superficie (Nash y cols., 1988; Aggarwal y Nash., 1988; Enciso y cols., 1988), antígenos de secreción-excreción (Nash y cols., 1983; Shant y cols., 2002, 2004a y 2004b), diferentes patrones de restricción de ADN (Nash y cols., 1985) y de infección en modelos animales (Aggarwal y cols., 1987; Udezulu y cols., 1992), así como en infecciones experimentales en humanos (Nash y cols., 1987).

Es evidente que la patogénesis de la giardiosis se relaciona con la capacidad de adhesión de *Giardia* a las células epiteliales del intestino, la cual representa durante el proceso infeccioso una parte esencial para la colonización y persistencia del parásito.

A este respecto, se han propuesto diferentes posibles mecanismos de adhesión de este parásito:

➤ Mediante una **fuerza de succión** generada por debajo del disco ventral por movimientos propulsivos del flagelo ventral. Este proceso depende de un metabolismo activo y es inhibido por oxígeno, temperatura baja, concentraciones bajas de cisteína. Los elementos de citoesqueleto del disco, son los principales mediadores de este proceso; además existen evidencias de que los inhibidores de microtúbulos, incluyendo antagonistas de la β -tubulina, inhiben la adhesión *in vitro* (Crossley y Holberton., 1983; Meloni y cols., 1988; Edlind y cols., 1990; Magne y cols., 1991).

➤ Por **procesos mecánicos** relacionados con proteínas contráctiles del disco ventral y del fleco ventrolateral (Crossley y Holberton., 1983; Peattie, 1990). El disco ventral es relativamente rígido, sin embargo, el borde que se proyecta alrededor del disco es flexible y se han identificado varias proteínas contráctiles en este borde, que permiten el contacto con el borde de las microvellosidades del intestino delgado (Feely y cols., 1982; Adam, 1991). Asimismo, se ha demostrado que el disco ventral contiene proteínas de citoesqueleto únicas llamadas giardinas, las cuales pueden ser de dos tipos: β -giardinas y α -giardinas. Estas proteínas fueron identificadas primero como un par de proteínas de aproximadamente 30 kDa, que pueden ser extraídas a partir del citoesqueleto de *Giardia*, pero más recientemente se han definido como un grupo de proteínas del citoesqueleto de entre 29-38 kDa.

Se cree que tanto las α -giardinas como las β -giardinas juegan un papel importante en el funcionamiento del disco ventral y son buenos candidatos para el ataque quimioterapéutico específico (Crossley y Holberton, 1983; Peattie, y cols., 1989; Peattie, D. A., 1990; Chávez, y cols., 1995). Otra proteína contráctil que se ha estudiado es la **vinculina**, la cual une al citoesqueleto con la membrana plasmática y está localizada en muchos puntos de contacto célula-célula y célula-sustrato (Narcisi y cols., 1994). Este último hecho sugiere que la vinculina juega un papel importante en el proceso de adhesión de *Giardia*.

➤ Por medio de **moléculas de superficie** que permiten la unión del trofozoito a receptores en las células epiteliales del hospedero (Lev y cols., 1986; Ortega-Pierres y cols., 1991; Pegado y cols., 1994). En la superficie de los trofozoitos de *Giardia* se caracterizó una lectina, denominada **taglina**, que se une a manosa 6-fosfato; se ha propuesto que esta molécula representa otro mecanismo de adhesión del parásito a las células del intestino. Esta lectina es activada específicamente por exposición a tripsina, una proteinasa que está presente en abundancia en el sitio de la infección. La activación de la taglina por tripsina, una enzima presente en abundancia en el sitio de la infección y que la lectina activada aglutina a las células intestinales para lo cual el parásito se adhiere *in vivo*, sugieren que la taglina es importante para la unión de los trofozoitos a las células del hospedero (Hill y cols., 1981; Lev y cols., 1986; Farthing y cols., 1986; Ward y cols., 1987; Ward y cols., 1990).

Aunado a lo anterior, se han obtenido anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos de proteínas de superficie y se ha demostrado la inhibición de adhesión del trofozoito a células MDCK con el empleo de estos anticuerpos (Ortega-Pierres y cols., 1991). Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), en este estudio se observó que uno de estos anticuerpos monoclonales (1G3) reaccionaba con más del 99% de trofozoitos de la cepa WB y menos del 1% con la clona C7, obtenida de esta cepa, la cual es deficiente en su capacidad de adhesión. Por otro lado, en ensayos de IET al emplear extractos totales de la cepa WB, el anticuerpo 1G3 reconoció predominantemente una proteína de ≈ 200 kDa, la cual no fue reconocida en la clona C7. El hecho de que la clona C7 sea deficiente en adhesión y no tenga la molécula de 200 kDa sugiere la participación de ésta en el proceso de adhesión de los trofozoitos de *G. lamblia* a las células epiteliales. Además, al emplear jerbos como modelo animal se observó que la clona C7, tuvo una menor capacidad de colonización del epitelio intestinal (Hernández, 1992).

En los ensayos de adhesión *in vitro* descritos anteriormente se empleó la línea celular epitelial MDCK que proviene de riñón de perro. El empleo de otras líneas celulares de epitelio intestinal ha permitido así mismo estudiar los diversos mecanismos que participan en la adhesión de los trofozoitos del parásito a las células epiteliales. En este contexto, McCabe, y cols (1991) desarrollaron un modelo *in vitro* para estudiar la unión de los trofozoitos de la cepa P1 de *G. lamblia* a una línea celular epitelial intestinal de rata (IEC6). La línea celular IEC6 ha sido utilizada debido a que deriva de intestino delgado de rata; retiene características inmunológicas, enzimáticas y morfológicas de las criptas celulares de intestino de

rata, además de ser similar a las criptas celulares en la presencia de factores que regulan la proliferación celular. El proceso de adhesión se analizó por microscopía electrónica de transmisión y de barrido y se encontró que los trofozoitos permanecen unidos a la línea celular IEC6 por 24 h con poca evidencia de daño a estas células. La preincubación de los trofozoitos con las citocalasinas A, B y D reduce la adhesión aproximadamente 20%, mientras que la colchicina no tiene efecto alguno. El efecto de quelación de cationes divalentes con EDTA y EGTA disminuye la adhesión del parásito a la línea celular IEC6 en un 24% y 26% y la incubación a 4°C también reduce la adhesión en un 7%. Cuando los trofozoitos o las células IEC6 se fijaron con glutaraldehído se observó una marcada disminución en la adhesión al sustrato (17 y 40%). En esta misma línea celular, Pegado y Souza (1994) estudiaron la inhibición del proceso de adhesión de los trofozoitos de *G. lamblia* utilizando monosacáridos, lectinas, periodato, tripsina y neuraminidasa. En este estudio se demostró que la adición de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa y fucosa al medio de interacción inhiben la unión de los parásitos a las células epiteliales. Además, se demostró que los grupos sensibles a tripsina, pero no a neuraminidasa expuestos en la superficie celular, son importantes para la asociación parásito-célula epitelial.

En otro estudio en el que se empleó una línea celular diferente (CaCo-2) se observó que la adhesión de *Giardia* fue máxima entre 1-8 h y estable en un intervalo de pH de 7.2-8.2 y a valores de pH ácido disminuyó. Asimismo, se observó que la adhesión es dependiente de la temperatura y los valores máximos se alcanzan a 37°C y se abate por completo a 4°C. Al evaluar el efecto de diversos agentes se observó

una disminución en la adhesión con respecto a los controles con EDTA 2.5 mM, colchicina 12.5 μ M, mebendazol 10 μ g/mL y citocalasina B 1 μ g/mL. Así también la adhesión de *Giardia* disminuyó por preincubación con manosa 50 mM o manosa 6-fosfato 35 mM, o al preincubar las células Caco-2 con concanavalina A en concentración de 100 μ g/mL. Al evaluar la adhesión entre tres diferentes aislados y la cepa de referencia no se observaron diferencias. Así, la adhesión de este parásito a las células Caco2 es principalmente por mecanismos del citoesqueleto inhibibles por interferencia con los filamentos contráctiles y microtúbulos, mientras que la unión por la lectina de unión a manosa también desempeña un papel en el proceso de adhesión (Katelaris y cols., 1995)

Por su parte, Sousa y cols. (2001) empleando la línea celular intestinal humana Int-407 como un modelo *in vitro*, estudiaron el papel del citoesqueleto y las lectinas de superficie involucradas en la adhesión del parásito. Se observó que la adhesión fue inhibida por colchicina y mebendazol, agentes que afectan la función microtubular. La adhesión no fue afectada cuando los trofozoitos se pretrataron con EDTA y las citocalasinas B y D, lo que sugiere que el sistema actina-miosina del parásito no interfiere con el proceso de adhesión en este modelo, así también la adhesión mediada por la lectina fue evidente en este estudio y se inhibió por manosa 6 fosfato y concanavalina, consistente con un residuo manosil como blanco para la unión, y por glucosa y manosa lo que reafirma el papel de la lectina específica de glucosa-manosa. Este estudio fundamenta el papel primario de la unión por efectos mecánicos vía el disco ventral destacando un papel importante de los microtúbulos.

En otros estudios, Roskens y Erlandsen (2002) evaluaron el efecto de diferentes condiciones en la adhesión *in vitro* del parásito, entre ellas la presencia de mucina en la adhesión de los trofozoitos de *Giardia*. Desarrollaron un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) para cuantificar el número de trofozoitos unidos al sustrato. Observaron que la colchicina y el nocodazol (inhibidores de microtúbulos) son efectivos para bloquear la adhesión después de 5-10 min de incubación. En cambio, la citocalasina B, inhibidor de actina, reduce la adhesión a los mismos tiempos de incubación. El hallazgo más importante de este estudio es la inhibición de la adhesión por presencia de mucina en los sustratos. Esta inhibición fue significativa después de 5 min de incubación de los trofozoitos en los pozos cubiertos de mucina, y podría estar relacionada con una repulsión electrostática, ya que los trofozoitos de *Giardia* poseen una carga negativa en la superficie y las moléculas de mucina se sabe que están altamente glucosiladas y forman polímeros polianiónicos. Faltaría investigar cuál es el papel fisiológico que tiene la mucina en el micro-ambiente intestinal habitado por los trofozoitos de *Giardia*. En mamíferos, se expresan diferentes genes de mucina en el tracto gastrointestinal, sin embargo, se tiene poca información respecto al papel de éstas en la fisiología intestinal.

Recientemente, Bermúdez y cols. (2004) mediante análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos en contra de un péptido codificado por un fragmento de 450 pb mostrando que la expresión de este epitopo en la superficie de los trofozoitos de la clona C8 varía y está involucrado en la adhesión del parásito a las células epiteliales. En ese trabajo se clonaron dos fragmentos de ADN que codifican para un péptido de la cepa P1 de *G. duodenalis*, el cual existe en una familia

de genes ricos en cisteína basada en la homología con otros genes de VSP, principalmente vsp9B10A. La clona VSP63 codifica un péptido con motivos Cys-X-X-Cys y se piensa que corresponde a un segmento interno de VSP9B10A debido a que el dominio amino terminal requerido para la traslocación está ausente. Los resultados obtenidos con ensayos de inmunoelectrotransferencia indican que el antisuero obtenido en ratones contra el polipéptido de fusión de la clona lambda gt11VSP63-1 reacciona contra una proteína de 63 kDa del extracto total de la clona C8 de *G. lamblia*. Esta clona mostró mediante PCR que tiene un fragmento tipo vsp9B10A. Se identificó a VSP63-2 usando a VSP63-1 como una sonda para buscar en la biblioteca de expresión de *Giardia*. La secuencia de la clona 2 se comparó con el gen vsp9B10A y los resultados sugieren que VSP63 puede ser una proteína tipo VSP9B10A. Se encontró que hay pocos cambios (9 en total) dentro de la secuencia de VSP63 cuando se compara con la secuencia de VSP9B10A y no se observaron cambios en el marco de lectura abierta. Estos hallazgos sugieren que VSP63 podría ser parte de la familia de genes de VSP9B10. En este trabajo se presentó la primera evidencia de que las proteínas VSP están involucradas en la adhesión del parásito a las células del hospedero.

I.7 Actividad de proteinasas en protozoarios y su relación con la patogenicidad

Las proteinasas desempeñan un papel esencial en muchos aspectos de la relación hospedero-parásito. Algunas de ellas son sintetizadas y presentan actividad elevada en diferentes estadios del ciclo de vida del parásito. Las proteinasas parasitarias en algunos casos facilitan la invasión de los tejidos del hospedero, así como la evasión de la respuesta inmunológica del mismo. Además, contribuyen a que se lleven a cabo

los cambios morfológicos del parásito y que éste efectúe su metabolismo dentro del hospedero (McKerrow y Doenhoff, 1988).

Las proteinasas juegan un papel importante durante la adhesión de microorganismos a la célula blanco. Estas enzimas actúan degradando proteínas estructurales de la membrana para permitir la penetración del parásito al tejido del hospedero, no sólo con propósitos de nutrición, sino que las proteinasas también están involucradas en procesos de citoadherencia de organismos patógenos como en *Trichomonas vaginalis* o implicadas en la adhesión a tejidos como en *Trypanosoma cruzi* requiere la acción de una proteinasa durante la maduración para parasitar eficazmente las células del hospedero. Asimismo, se ha descrito el papel de las proteinasas durante la invasión de parásitos de *Plasmodium* a eritrocitos.

Un parásito ampliamente estudiado a la fecha y en el que se ha detectado la presencia de actividad proteolítica es *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amebiasis. En el caso de los trofozoitos de la cepa HM1- IMSS se ha detectado actividad colagenolítica. Esta actividad proteolítica actúa preferencialmente sobre la colágena tipo I y se encuentra asociada a la membrana del parásito, además esta actividad depende del contacto con la célula blanco (Muñoz y cols., 1982). Se han identificado otras proteinasas de este parásito a partir de extractos totales de trofozoitos, en especial se ha caracterizado una enzima con un peso molecular de 41 kDa que hidroliza hemoglobina a pH ácido y su actividad es semejante a la de la catepsina D, además de una cisteína-proteinasa que tiene un peso molecular de 27 kDa (McLaughlin y cols., 1977). Keene y cols. (1986) purificaron una cisteína

proteínasa de 56 kDa a partir de productos de secreción de trofozoitos de las cepas HM1- IMSS y HK- 9. Los autores denominaron a esta enzima proteasa neutra principal. Esta presentó la capacidad de degradar un modelo de matriz extracelular de tejido conectivo así como fibronectina, laminina y colágena tipo I. De la misma manera, causó redondeamiento y desprendimiento de células de mamífero en cultivo (efecto citopático), quizá debido a su capacidad de degradar proteínas de anclaje como la fibronectina y la laminina. La actividad proteolítica fue mayor en la cepa HM1- IMSS que en la clona mutante L-6 de la cepa HM1- IMSS, la cual es deficiente en la expresión de la proteasa neutra principal, siendo el efecto citopático en células de cultivo directamente proporcional a su actividad proteolítica. Aunado a lo anterior, el análisis de los aislados de *E. histolytica* obtenido de pacientes con amibiasis invasora, reveló que estos presentaban actividad proteolítica tipo cisteína-proteínasa neutra. En contraste, esta actividad sólo fue observada en 1 de 10 aislados de pacientes asintomáticos. Lo anterior sugiere que la actividad de este tipo de proteasa participa en la patogénesis amibiana (Reed y cols., 1989; North y cols., 1990b). Lushbaugh y cols (1985), reportaron la purificación de una proteínasa de tipo cisteína con peso molecular de 16 kDa de las cepas HM1- IMSS de alta virulencia y HK- 9 de menor virulencia. La enzima hidroliza azocaseína, hemoglobina y carboxi- L-arginil-L-arginil-7-amino-4-trifluorometilcumarina (Z-arg-arg-AFC), un sustrato preferencial de la catepsina B de mamífero, razón por la que denominaron esta actividad proteolítica como catepsina B de *E. histolytica*. La enzima causó un redondeamiento y desprendimiento de las células HeLa en cultivo. Este efecto fue inhibido con antipaína, un inhibidor de cisteína-proteínas y reforzado por cisteína. En estos

estudios, se observó que la cepa HM1- IMSS presentó mayor actividad proteolítica en comparación con la cepa HK-9, lo que sugiere una correlación de la actividad invasora con la cantidad de proteinasa presente en cepas de este parásito que presentan diferentes grados de virulencia.

En otros estudios Luaces y Barret (1988) purificaron una proteinasa de tipo cisteína llamada histolisina, a partir de extractos solubles de la cepa HM1- IMSS con un peso molecular de entre 26 a 29 kDa. Esta proteinasa tiene actividad sobre diferentes sustratos: azocaseína y Z-arg-arg-NHMec, no degrada colágena tipo I o elastina, pero es activa contra proteoglicanos de cartílago y colágeno de membrana basal del glomérulo renal. Asimismo, se observó que esta enzima ocasiona redondeamiento y desprendimiento de fibroblastos humanos en cultivo. Esta enzima presenta características diferentes a las de la catepsina B previamente caracterizada. Asimismo, Rodríguez y cols (1994) determinaron la presencia de una proteinasa del tipo cisteína de 112 kDa involucrada en la adhesión a las células blanco. *E. histolytica* posee una metalocolagenasa unida a membrana que degrada colágena tipo I y III. El grado de actividad colagenolítica se ha asociado a la virulencia de los diferentes aislados. La activación de la enzima resulta aparentemente en la translocación de ésta de las membranas internas a la membrana plasmática (Espinosa-Castellano y Martínez-Palomo., 2000).

Por otro lado, en *Plasmodium falciparum* se ha detectado actividad de proteinasas específicas de estadio, la cual es requerida por el parásito para llevar a cabo un gran número de funciones (Rosenthal y cols., 1987, 1988 y 1989).

En relación a *Trypanosoma cruzi*, las proteinasas participan en la nutrición del parásito a expensas del hospedero, aunque también parecen estar involucradas en otros aspectos de la relación hospedero-parásito. Existen evidencias de que estas pueden estar involucradas en la penetración del tripomastigote en la célula del hospedero (Piras, 1985). Además, se ha demostrado que una enzima, la catalasa, es capaz de satisfacer los requerimientos de aminoácidos de los epimastigotes de *T. cruzi*, sugiriendo que son tomados por el parásito y degradados por proteinasas. Se han descrito en epimastigotes de *T. cruzi* cuatro actividades proteolíticas, diferentes unas de otras (Itow y Camargo., 1977).

De forma especial, *T. cruzi* presenta una enzima de **60 kDa** que es una glucoproteína con alto contenido de manosa, su secuencia parcial presenta alta homología con la papaína y la catepsina L; se encuentra en los lisosomas de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes. Ha sido localizada sobre la superficie de amastigotes y epimastigotes, mientras que en los tripomastigotes se ha localizado en la bolsa flagelar del organismo. Esta enzima, llamada cruzipaina, presenta una actividad mayoritaria en epimastigotes, lo cual sugiere que la expresión de la enzima está regulada por el desarrollo (Campetella y cols., 1990). La localización subcelular de la cruzipaina ha sido determinada por métodos bioquímicos (Bontempi y cols., 1989) y por experimentos de microscopía inmunoelectrónica (Souto-Padrón y cols., 1989) utilizando el mismo antisuero policlonal mono específico que previamente mostró ser capaz de detectar la cisteína-proteinasa específicamente en IET (Campetella y cols., 1990). Estos estudios sugieren que así

como la enzima se encuentra localizada en lisosomas, también puede encontrarse en la superficie de epimastigotes y amastigotes, y también en el estado de transición de las formas tripomastigote-amastigote.

Además de las proteinasas de tipo cisteína y metalo, hay evidencias de la presencia de una proteinasa de tipo serina en *T. cruzi* (Sakanari y cols., 1989; Greig y Ashall, 1990). Así, se obtuvo y se secuenció un fragmento de 438 pares de bases y se encontró que contiene regiones que codifican para las secuencias conservadas de aminoácidos del sitio activo de una serina-proteinasa. De esta manera, aún cuando no se ha encontrado actividad de proteinasa de tipo serina en este parásito, sí se tiene un gen que codifica para ésta.

De esta manera, se han reportado varios trabajos donde las proteinasas de *T. cruzi* juegan un papel importante en la biología del parásito: algunas intervienen en la replicación de los amastigotes (Harth y cols., 1993); se ha observado que durante la metacicloénesis varía la expresión de proteinasas del parásito (Bonaldo y cols., 1991); también se sugiere la participación de proteinasas en la adhesión e infección a fibroblastos (Piras y cols., 1985); de la misma manera, al inhibir tales proteinasas con inhibidores químicos o tratarlas con anticuerpos monoclonales monoespecíficos se encontró que disminuía significativamente la ingestión de parásitos por macrófagos y células musculares de corazón (Meirelles y cols., 1992; Souto- Padrón y cols., 1990). Por otro lado, los tripomastigotes pueden romper las moléculas de IgG unidas a la membrana desprendiendo la parte Fc y quedándose sólo con la fracción

Fab. Este proceso podría ayudarles a pasar inadvertidos al circular por el organismo del hospedero (Pereira., 1990).

En comparación con muchos otros protozoarios, las *Trichomonas* particularmente, tienen altos niveles de proteinasas; esto puede ocasionar problemas durante el aislamiento y análisis de las proteínas de este parásito (Alderete y Neale, 1989; North, 1982). Estas proteinasas son activas en un amplio intervalo de pH (4-8). Con derivados de péptidos como sustrato, el pH óptimo de éstas es normalmente entre 6 y 8. El análisis electroforético en geles PAGE-SDS copolimerizados con gelatina ha revelado que todas las especies tienen múltiples proteinasas, la mayoría de ellas del tipo cisteína. Recientemente, sin embargo, se ha visto que por lo menos tres especies de *trichomonas* tienen múltiples metalo proteinasas, las cuales son activas en un valor de pH entre 8 y 9. De esta forma, Coombs (1982) demostró altos niveles de actividad proteolítica mediante el empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, los cuales contenían hemoglobina (Coombs y North, 1983). Subsecuentemente, Lockwood y cols, (1987), empleando geles PAGE-SDS copolimerizados con gelatina mostraron que había por lo menos 11 cisteína-proteinasa diferentes. Todas estas proteinasas son inhibidas por reactivos específicos para cisteína-proteinasa, E64 y cistatina (North y cols., 1990). En estos geles se han resuelto 23 distintas proteinasas, las cuales tienen puntos isoeléctricos de entre 5.7 a 7.0 (Neale y Alderete, 1990). Las proteinasas con puntos isoeléctricos menores han sido detectadas por PAGE-SDS-gelatina en una dimensión. En general, estas proteinasas son más ácidas. Bóznér y Demes (1991b), reportaron dos enzimas con peso molecular

alto las cuales son inhibidas por EDTA, pero no por inhibidores para proteinasas de tipo cisteína, por lo que se les consideró metalo-proteinasas. El patrón de proteinasas detectado por geles PAGE- SDS con sustrato, muestra algunas variaciones entre aislados (Lockwood y cols., 1987; Neale y Alderete, 1990). Lockwood y cols. (1985, 1986), describen la purificación de dos cisteína-proteinasas intracelulares, la proteinasa D y la H, las cuales difieren en peso molecular, la primera tiene un peso de 18 kDa y la segunda de 64 kDa y sus puntos isoeléctricos son 5.2 y 5.9, respectivamente. También se han purificado dos cisteína-proteinasas extracelulares (Garber y Lemchuk-Favel., 1989). La primera de estas proteinasas tiene un peso molecular de 60 kDa y es separada en subunidades de 23 y 43 kDa; mientras que la segunda enzima tiene un peso molecular de 30 kDa.

Los lisados de *T. vaginalis* son capaces de hidrolizar muchas proteínas y derivados de péptidos. Las proteinasas D y H purificadas muestran poca diferencia en cuanto a la especificidad para cada actividad en los lisados crudos. Entre las nitroanilidas probadas, el mejor sustrato fue Bz-Pro-Phe-Arg-Nan (Bz= benzoil; Nan= nitroanilida) y los sustratos preferidos fueron aquellos combinados con arginina en la posición P₁ con un residuo voluminoso en la posición P₂ (Lockwood y cols., 1984, 1986). El uso de sustratos fluorogénicos (peptidilaminometilcumarinas) en combinación con PAGE-SDS gelatina (North y cols., 1990) ha permitido determinar la especificidad del sustrato de cada enzima sin necesidad de purificarlas.

En cuanto a la activación de moléculas de superficie importantes en la adhesión a células epiteliales vaginales humanas (VEC) y a células HeLa, esto se ha relacionado también con la producción de proteinasas (Arroyo y Alderete, 1989). Este proceso en *Trichomonas* es dependiente de tiempo, temperatura y pH, así como alteraciones relacionadas con citoesqueleto; así, los inhibidores para microtúbulos y microfilamentos afectan adversamente la citoadherencia. Del mismo modo, el tratamiento de proteinasas de organismos vivos abate la adhesión del parásito a las células del hospedero lo que indica, como se mencionó anteriormente, que están involucradas proteínas específicas de la superficie de este parásito están involucradas. Cuando se les permite sintetizar y re-expresar las proteínas de superficie a las *Trichomonas* tratadas con tripsina, vuelven a adquirir el fenotipo de adhesión. Por otro lado, la adición de azúcares y lectinas a la mezcla de células del hospedero-parásito y el tratamiento de los organismos vivos con periodato y glucosidasa no interfieren con el proceso de adhesión (Alderete y Garza., 1985).

Por otro lado, el tratamiento de *T. vaginalis* con inhibidores de proteinasas específicos para las de tipo cisteína, da como resultado que el parásito no se adhiera a células epiteliales del hospedero. *T. vaginalis* presenta una gran actividad proteolítica, tanto en el contenido intracelular, como en el medio en donde ha sido cultivada. Esta actividad proteolítica ha sido determinada en geles de poliacrilamida con sustrato de gelatina. La actividad proteolítica predominante presente en los lisados tiene pesos moleculares de 68 a 110 kDa. Las proteinasas tanto intracelulares como extracelulares en *Trichomonas*, se han caracterizado principalmente como cisteína-proteinasa. En este parásito también se ha

observado, mediante estudios de microscopía electrónica que los parásitos crecidos *in vitro* tienen una forma globular típica, la cual sufre una transformación rápida inmediatamente después del contacto con células epiteliales vaginales (VEC's) en células ameboides, las cuales maximizan de esta manera el área de adhesión a las células VEC's. En contraste, la transformación ameboide no ocurre cuando el parásito interactúa con células HeLa. Además, para que el parásito se adhiera tanto a las células VEC's como a las HeLa hubo inducción hacia la síntesis de grandes cantidades de las cuatro adhesinas (Alderete, y cols., 1988; Arroyo, y cols., 1992). Del mismo modo, se ha observado que el cultivo *in vitro* de aislados frescos disminuyen los niveles de citoadherencia a las células epiteliales, con la subsecuente reducción en las cantidades de las cuatro adhesinas.

La expresión genética de las adhesinas de *T. vaginalis* es regulada por hierro (Lehker, y cols., 1991) y se encontró que esta señal del medio ambiente afecta la velocidad de crecimiento del parásito, su multiplicación y la expresión de inmunógenos. Estas adhesinas han sido identificadas empleando un ensayo de ligandos y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales para cada una de las cuatro adhesinas se detectan las proteínas en la superficie de los organismos vivos y se inhibe la citoadherencia. El empleo de los anticuerpos monoclonales hace posible demostrar que las adhesinas no dan reacciones cruzadas, indicando que son codificadas por distintos genes. Las adhesinas purificadas también inhiben la unión del parásito a las células del hospedero, en función de la concentración de éstas. Las cantidades de las adhesinas sintetizadas correlacionan con las cantidades expresadas en la superficie y a su vez con los niveles de citoadherencia. Sin

embargo, la presencia de las adhesinas expresadas en la superficie no es suficiente para que el parásito se adhiera; utilizando inhibidores de proteinasas de cisteína, el requerimiento adicional para la actividad de las proteinasas en el reconocimiento de *T. vaginalis* y la unión a las superficies de las células del hospedero es muy grande. La función exacta de las proteinasas permanece desconocida aunque se propone que tienen función desenmascarante. Las adhesinas presentes en la superficie del parásito son protegidas por proteínas, por lo tanto se requiere que queden expuestas para que sean funcionales (Alderete y cols., 1995)

Alvarez y cols. (2000) determinaron el papel de una cisteína proteinasa (CP65) de *T. vaginalis* en el daño celular a monocapas de células HeLa. Mediante el empleo de electroforesis bidimensional de las proteínas de *Trichomonas* se detectaron 4 manchas con actividad proteolítica en la región de 65 kDa y una sola mancha con un pI de 7.2 que se une a la superficie de las células HeLa. CP65 fue citolocalizada en la membrana plasmática y en citoplasma del parásito. Al emplear el inhibidor E64 disminuyó la actividad de la proteinasa y por lo tanto reduce los niveles de citotoxicidad de *T. vaginalis* en monocapas de cultivo celular, indicando que la CP65 es una proteinasa de tipo cisteína. Esta proteinasa es activa a pH 5.5 y 37°C condiciones a las cuales se encuentran los pacientes con tricomoniosis. De esta manera, la CP65 degradó algunas de las proteínas encontradas en la vagina como colágena IV y fibronectina, no siendo así en el caso de hemoglobina y laminina 1. Cuando se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, se observó que en suero y exudados vaginales de pacientes con tricomoniosis existen anticuerpos anti-CP65. En conjunto, estos hallazgos determinaron a la CP65 como factor de virulencia, ya

que está involucrada en la citotoxicidad del parásito a las células y es inmunogénica durante la infección humana.

Por otro lado, Mendoza y cols (2000), caracterizó y determinó la participación de una cisteína-proteinasa de 30 kDa en el proceso de adhesión del parásito a las células. Datos obtenidos de estudios de inhibición sugieren un papel para esta proteinasa en la virulencia del parásito (Arroyo y Alderete, 1995). El tratamiento de parásitos vivos con Leupeptina o TLCK disminuyó la citoadherencia de los parásitos así como la actividad de la CP30. Experimentos de inmunofluorescencia demostraron la localización de la CP30 en la superficie del parásito. De manera interesante, la mitad de la población de los parásitos del aislado analizado en este estudio posee la CP30 en su superficie, aunque todos mostraron reactividad en el citoplasma. El anticuerpo contra CP30 inhibió la citoadherencia de una manera dependiente de la concentración (Arroyo y cols., 1992). Estos datos confirman que el reconocimiento de *T. vaginalis* y su unión a las células del hospedero son eventos multifactoriales, es decir, una cisteína-proteinasa es necesaria (Arroyo y Alderete., 1989) y varios otros factores participan (Arroyo y cols., 1992; Arroyo y cols., 1993; Silva-Filho y cols., 1988; Silva-Filho y cols., 1998). Así mismo, esta proteinasa es secretada en el medio ambiente vaginal, así como en el medio de cultivo durante el crecimiento *in vitro*. Esta secreción es estimulada por contacto con las monocapas de las células HeLa y es capaz de unirse a la superficie de las mismas.

A este respecto, Hernández-Gutiérrez y cols., (2004) caracterizaron una cisteína-proteinasa de *T. vaginalis* (CP39) la cual es encontrada en las secreciones

vaginales de las pacientes con tricomoniosis. Esta proteinasa se une a células epiteliales HeLa, vaginales epiteliales (VEC) y células de cáncer prostático humano (DU-145). CP39 no se une a células de cáncer de colon humano CaCo-2, lo que sugiere que la unión a las células es tejido-específica. CP39 aparece como un solo punto con pI 4.5, es inhibida por E64, estable a 50°C y activa en un intervalo amplio de pH (3.6-9.0) siendo el valor óptimo de pH de 7.0. Además esta proteinasa degrada colágena tipo I, III, IV y V, fibronectina y hemoglobina humanas, así como inmunoglobulinas A y G. Los resultados obtenidos en ensayos de IFI, empleando el anticuerpo policlonal en contra de la CP39 mostraron que ésta se encuentra en superficie. Además se encontró que es inmunogénica, por lo que los datos sugieren que juega un papel importante en la infección por tricomonas, probablemente como factor de virulencia. En estudios adicionales por Hernández y cols., (2004) se estudió el papel de una proteinasa de excreción-secreción de 62 kDa en la citoadherencia de *T. vaginalis*. Se utilizaron anticuerpos monoclonales en contra de esta proteinasa para evaluar la capacidad de inhibición del proceso. Los anticuerpos inhibieron la citoadherencia del parásito a monocapas de células HeLa. Además, un anticuerpo (4D8) administrado 24 h antes de un reto con *T. vaginalis* por vía intraperitoneal fue capaz de proteger a la mayoría de los ratones.

II. OBJETIVOS

• GENERAL

Evaluar la participación de proteinasas de trofozoitos de la cepa WB de *G. lamblia* en el proceso de adhesión a la línea celular epitelial IEC6 y en el reconocimiento de la superficie de estas células

• PARTICULARES

- Determinar la secreción de proteinasas por trofozoitos de *G. lamblia*, solos o en interacción con células epiteliales IEC6 y su participación en el proceso de adhesión
- Identificar proteinasas de *G. lamblia* que intervienen en el reconocimiento de la superficie de las células epiteliales, mediante el ensayo de ligandos-proteinasas
- Caracterizar la(s) proteínasa(s) de *G. lamblia* que reconocen la superficie de la línea celular IEC6
- Determinar la localización de la(s) proteínasa(s) de *G. lamblia* obtenida(s) del ensayo de ligandos-proteínasa en fracciones celulares del parásito
- Determinar la localización de la(s) proteínasa(s) de *G. lamblia* obtenida(s) del ensayo de ligandos-proteínasa mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta

I.9 Justificación

En base a lo expuesto anteriormente, es claro que aún cuando se cuenta con varios estudios acerca de la presencia de proteinasas tanto en los lisados totales de trofozoitos de *G. lamblia*, así como en los sobrenadantes, es decir como productos de excreción/secreción. No obstante en ninguno de los estudios anteriormente mencionados se ha estudiado la participación de proteinasas en la adhesión del parásito a la célula blanco, aún cuando es claro que el proceso de adhesión es un paso esencial en la patogénesis de la giardiosis y que en este proceso intervienen elementos del disco ventral y proteínas de superficie que podrían actuar como adhesinas. Por otro lado, se sabe que las proteinasas intervienen en muchas funciones celulares y que en otro parásito protozoario, como es *T. vaginalis*, tienen un papel fundamental en la adhesión a células epiteliales.

Nuestro grupo de investigación determinó por primera vez la relación entre la producción de proteinasas por trofozoitos de *G. lamblia* y la patogenia de la enfermedad, específicamente en el proceso de adhesión de este parásito. En este estudio se caracterizó la actividad proteolítica en la cepa WB y en 2 clonas derivadas de ésta, la C5 y C7 (deficiente en su capacidad de adhesión). Mediante análisis electroforético, se determinó que la cepa WB y la clona C5 tenía por lo menos 7 bandas con actividad proteolítica entre 19-160 y 19-180 kDa, respectivamente. En cambio en la clona C7, únicamente se detectó la presencia de 4 proteinasas de entre 80-126 kDa. Al emplear inhibidores específicos de proteinasas se detectó que en su mayoría estas actividades son del tipo cisteína. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de adhesión a la línea celular IEC6 y trofozoitos pre-tratados con inhibidores, observándose una

inhibición de la adhesión en el caso de la cepa y la clona C5 principalmente, aunque también en la clona C7 se observó inhibición de la adhesión, lo cual sugiere que las proteinasas están interviniendo en la adhesión del parásito a la célula blanco (Rodríguez-Fuentes, 1998).

Considerando los resultados de este estudio, resultó de interés continuar con el análisis de la participación de las proteinasas secretadas del parásito en el proceso de adhesión a células epiteliales, así como la identificación y caracterización de proteinasas que reconocieran la superficie de las células IEC6.

II. OBJETIVOS

• GENERAL

Evaluar la participación de proteinasas de trofozoitos de la cepa WB de *G. lamblia* en el proceso de adhesión a la línea celular epitelial IEC6 y en el reconocimiento de la superficie de estas células

• PARTICULARES

- Determinar la secreción de proteinasas por trofozoitos de *G. lamblia*, solos o en interacción con células epiteliales IEC6 y su participación en el proceso de adhesión
- Identificar proteinasas de *G. lamblia* que intervienen en el reconocimiento de la superficie de las células epiteliales, mediante el ensayo de ligandos-proteinasas
- Caracterizar la(s) proteinasa(s) de *G. lamblia* que reconocen la superficie de la línea celular IEC6
- Determinar la localización de la(s) proteinasa(s) de *G. lamblia* obtenida(s) del ensayo de ligandos-proteinasas en fracciones celulares del parásito
- Determinar la localización de la(s) proteinasa(s) de *G. lamblia* obtenida(s) del ensayo de ligandos-proteinasas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- PARÁSITOS Y CÉLULAS EPITELIALES

Trofozoitos de la cepa WB de *Giardia lamblia* y células epiteliales de íleon de rata.

2.- CULTIVO DE TROFOZOITOS DE *G.lamblia*

Los trofozoitos de la cepa WB se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 modificado (Apéndice B) complementado con suero de ternera definido al 10% (v/v) y en presencia de los antibióticos estreptomicina (250 µg/mL) y penicilina (250 UI/mL). Se llevaron a cabo subcultivos dos veces por semana de acuerdo a lo recomendado por Cedillo-Rivera y cols, (1992).

3.- OBTENCIÓN DEL LISADO TOTAL (LT) DE TROFOZOITOS

Los trofozoitos de la cepa WB fueron cosechados en la fase logarítmica de crecimiento, mediante 1 h de enfriamiento de los tubos de cultivo a 4°C y posterior centrifugación a 800 xg durante 10 min. El paquete celular se lavó dos veces con amortiguador salino de fosfatos (AFS) pH 7.2, y una vez en una solución de sacarosa 0.25 M. La viabilidad celular se verificó con azul tripano. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en una solución que contenía 25 µL de sacarosa 0.25 M, 25 µL de Tritón X-100 al 0.25% y 10 µL de amortiguador de muestra 5X en ausencia de β-mercaptoetanol (Apéndice C). Los trofozoitos fueron lisados por agitación con pipeta y la cuantificación de

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

4.- CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES IEC6

Las células epiteliales de íleon de rata (IEC6) se cultivaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ hasta formar una monocapa confluyente en medio de Eagle modificado por Dulbecco para hibridomas (D-MEM-Hyb) adicionado con suero fetal de ternera definido al 10%(v/v). Además, se añadió al medio de cultivo glutamina 2 mM e insulina (10 U/mL) y los antibióticos estreptomina y penicilina y como antimicótico fungizona (2.5 mg/L). Una vez formada la monocapa, esta se tripsinizó con una solución de tripsina al 0.1% durante 15 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con D-MEM-Hyb sin suero y las células se contaron en una cámara de Neubauer. Al final, se hicieron inóculos de 1.2×10^6 células de IEC6 por botella de cultivo en un volumen total de 5.0 mL de D-MEM-Hyb. Se realizaron cambios de medio de cultivo hasta obtener nuevamente una monocapa celular confluyente, a partir de la cual se obtuvieron las células que se crecieron en botellas de cultivo de 25 mL para que una vez confluentes se utilizaran en ensayos de ligando-proteinasas, así como en los ensayos de adhesión de los trofozoitos a las células IEC6 y en el análisis de la secreción de proteinasas por los trofozoitos en interacción con las células epiteliales.

5.- ENSAYO DE ADHESIÓN DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* A CÉLULAS EPITELIALES IEC6

Los ensayos de adhesión de los trofozoitos de *G. lamblia* de la cepa WB se llevaron a cabo sobre las monocapas confluentes de células IEC6. En microplacas de cultivo de 24 pozos se colocaron 1×10^5 células y se mantuvieron en cultivo hasta obtener monocapas confluentes. Por otro lado, los trofozoitos cosechados en la fase logarítmica de crecimiento se marcaron con $2 \mu\text{Ci/mL}$ de $[\text{H}^3]$ timidina y se incubaron durante 48 h a 37°C y nuevamente se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento mediante enfriamiento de los tubos durante 1 h. Posteriormente los trofozoitos se lavaron dos veces con D-MEM-Hyb sin suero y se cuantificaron. Los trofozoitos (1.3×10^6) se incubaron previamente con cada uno de los inhibidores seleccionados: E64 ($1 \mu\text{M}$) y TPCK ($50 \mu\text{M}$) por 30 min a 37°C . Los trofozoitos se lavaron con AFS y se incubaron con las células epiteliales (5×10^5) en un volumen final de $350 \mu\text{L}$ de D-MEM-Hyb sin suero, incubándose durante 2 h a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% (v/v). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo se retiró y se colectó en papel Whatman No.3. A su vez las monocapas, junto con los trofozoitos adheridos se colectaron de la misma forma con la ayuda de congelación a -70°C y adición de $200 \mu\text{L}$ de tripsina. Los papeles se secaron en un horno a 150°C durante 10 min y las proteínas se precipitaron en ácido tricloroacético al 10% durante 15 min, para posteriormente enjuagarlos con ácido tricloroacético al 5% y etanol. Los papeles se secaron nuevamente y se colocaron en una mezcla de centelleo que contenía PPO (2, 5- Difeniloxazol) y POPOP (p- bis[2- (5-feniloxazolil)]- benceno) en tolueno para ser leídos en un contador de centelleo

(Beckman Minaxi β tri-carb 4000 series). La suma de las lecturas de las células no adheridas (cpm no adheridas) en los sobrenadantes y adheridas (cpm adheridas) es el número de células totales (cpm totales) y se obtiene el % de inhibición considerando como el 100% a las cpm totales, de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ adhesión} = \frac{\text{cpm adheridas} \times 100}{\text{cpm totales}}$$

El control es considerado como 100% de adhesión, restándolo de cada valor de porcentaje de adhesión con cada uno de los inhibidores. Estas determinaciones se realizaron seis veces por duplicado cada una y los resultados mostrados son el promedio de éstas.

6.- ANÁLISIS DE LAS PROTEINASAS SECRETADAS POR TROFOZOITOS DE *G. lamblia*

Para determinar y caracterizar las proteinasas secretadas por los trofozoitos de *G. lamblia* cultivados solos ó en interacción con las células epiteliales IEC6, 1.3×10^6 parásitos de la cepa WB se incubaron solos o en presencia de 4.85×10^5 IEC6 por 2 h a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% (v/v).

Los sobrenadantes se colectaron y se filtraron a través de una membrana Millipore de $0.22 \mu\text{m}$ para tener la seguridad de la ausencia de trofozoitos en la

muestra y se concentraron 20 veces por medio de un sistema de ultrafiltración Centriprep con poro de exclusión de 10 kDa. En este ensayo también se analizaron los sobrenadantes de los trofozoitos que fueron pre-tratados con los inhibidores E64 y TPCK cultivados sólo o en interacción con las células IEC6. Los inhibidores se usaron a las mismas concentraciones empleadas en los ensayos de adhesión (inciso 7). En estos ensayos se incluyeron el medio D-MEM solo, y el sobrenadante de cultivo de las IEC6 solas. Los sobrenadantes (30 µg de proteína/pozo) se analizaron por PAGE-SDS al 10% en presencia de gelatina 0.2%. El corrimiento de las proteínas se realizó en cámaras de electroforesis Mini-Protean II por 90 min a 140 V a 4°C. En este análisis se emplearon peines de 10 pozos y 0.75 mm de grosor. Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento, los geles fueron re-naturalizados en 50 mL de Tritón X-100 al 2.5%(v/v) durante 1 h y se enjuagaron 3 veces con agua bidestilada para retirar el exceso de Tritón.

Para realizar la detección de todas las actividades proteolíticas, los geles se incubaron en amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5.5 en presencia de β-mercaptoetanol al 0.1%, durante 24 h a 37°C (Apéndice F) y en agitación. Al término de este período, los geles se volvieron a enjuagar con agua bidestilada y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 durante 45 min en agitación constante y a 37°C. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y se llevó a cabo la decoloración de éstos con una solución de ácido acético al 10% (v/v). Finalmente, los geles teñidos se analizaron por densitometría usando un analizador de imágenes Fotodyne™ integrado a una computadora Macintosh. La actividad

proteolítica de las diferentes bandas se calculó como porcentaje de la actividad medida en las bandas del control.

Con la finalidad de determinar la presencia de otras moléculas sin actividad proteolítica en los sobrenadantes, éstos fueron también analizados por PAGE-SDS al 10% en ausencia de gelatina y los geles fueron teñidos con nitrato de plata de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se analizaron por densitometría como se mencionó previamente.

7.- EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS TROFOZOITOS CON LAS CÉLULAS IEC6 MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Trofozoitos de la cepa WB (2.0×10^6) sin tratar ó pre-tratados por 30 min, con los inhibidores para proteinasas E64 ($1 \mu\text{M}$) y TPCK ($50 \mu\text{M}$), se pusieron en contacto con monocapas de células IEC6 durante 2 h/ 37°C . Después de este período de incubación, las muestras de los co-cultivos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en un amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2, se deshidrataron con diferentes concentraciones de etanol y posteriormente con óxido de propileno al 100%. Las muestras se secaron en un aparato Samdri-780 y se cubrieron con partículas de oro. Finalmente se realizaron las observaciones en un microscopio electrónico de barrido JEOL 35-C, también se analizaron cultivos de células IEC6 solas.

8.- FIJACIÓN DE CÉLULAS

Las células IEC6 se fijaron para llevar a cabo el ensayo de ligandos-proteinasas. Para esto, monocapas confluentes de células se despegaron con una solución de EDTA al 0.2% durante 90 min. Una vez despegadas todas las células se lavaron 3 veces con ASF pH 7.2 y se contaron en una cámara de Neubauer. Posteriormente, a 5×10^6 células/mL se les agregó glutaraldehído a una concentración de 2.5% y se incubaron en agitación durante 1 h/4°C. Transcurrido el tiempo de la incubación, las células se lavaron 5 veces con ASF pH 7.2 frío centrifugándolas a 600 xg/5 min a 4°C. Posteriormente, las células se bloquearon con glicina 0.2M durante un período de 1.15 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Las células se lavaron 7 veces con ASF pH 7.2 frío y 3 veces con solución TDSET (Apéndice H). Finalmente, las células se fraccionaron en tubos siliconizados a una concentración de 1×10^6 células/200 μ L y se almacenaron a 4°C hasta su empleo en el ensayo de ligandos-proteinasas.

9.- ENSAYO DE LIGANDOS-PROTEINASA

Con la finalidad de determinar las proteinasas presentes en el LT de trofozoitos de la cepa WB de *G. lamblia* que se unían a la superficie de las células epiteliales IEC6, se realizó el ensayo de ligandos-proteinasas. Las condiciones empleadas en el ensayo fueron las recomendadas por Alvarez-Sánchez y cols. (2000). Los trofozoitos (80×10^6) se lisaron con 500 μ L de ASF pH 8.0 y 50 μ L de DOC al 10% (concentración final 0.5%) y se incubaron en esta mezcla durante un período de 20 min a 4°C. Posteriormente, se adicionaron 450 μ L de ASF pH 8.0 y el lisado se colocó en un colchón de sacarosa al 10% (p/v), centrifugándose a 1 500 xg /30 min a 4°C. Una vez realizado lo anterior el sobrenadante

transparente que queda en la parte superior del gradiente, se puso en contacto con las células IEC6 previamente fijadas y lavadas durante 20 h a 4°C, con agitación suave. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 5 000 xg/5 min a 4°C. La pastilla obtenida se lavó 7 veces con DOC al 1% (p/v), se le agregaron 30 µL de amortiguador de muestra 1X y se incubó durante 20 min a 37°C. Finalmente la muestra se centrifugó a 1 500 xg/5 min a 4°C y las proteínas eluidas en el sobrenadante se cargaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (p/v) copolimerizado con gelatina al 0.2%, siguiendo las condiciones de corrimiento y tinción descritas en esta sección.

10.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

El análisis electroforético del LT, de los sobrenadantes de interacción de los trofozoitos con las células IEC6 y del eluido del ensayo de ligandos-proteinasas se realizó empleando geles de poliacrilamida al 10%(p/v) copolimerizados con gelatina al 0.2% (p/v). El eluido del ensayo de ligandos-proteinasas también se analizó empleando diferentes sustratos como mucina bacteriológica 0.5% (p/v), hemoglobina 1% (p/v), IgG, IgA, IgAs, en todos los casos se emplearon 1.5 mg/gel (Apéndice F). El corrimiento de las proteínas se realizó en las condiciones mencionadas previamente por 90 min a 140 V a 4°C. aplicándose en cada pozo 30 µL (equivalentes a 80×10^6 trofozoítos= 80 µg proteína) del eluido del ensayo de ligandos-proteinasas. Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento, los geles fueron re-naturalizados en 50 mL de Tritón X-100 al 2.5%(v/v) durante 1 h y se enjuagaron 3 veces con agua bidestilada para retirar el exceso de Tritón.

Para realizar la detección de todas las actividades proteolíticas, los geles se incubaron en amortiguador de acetatos 0.1M, pH 5.5 en presencia de β -mercaptoetanol al 0.1% (v/v), durante 24 h a 37°C (Apéndice F) y en agitación. Al término de este período, los geles se volvieron a enjuagar con agua bidestilada y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 durante 45 min en agitación constante y a 37°C. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y se llevó a cabo la decoloración de éstos con una solución de ácido acético al 10% (v/v). Finalmente, los geles se analizaron por densitometría usando un analizador de imágenes Fotodyne™ integrado a una computadora Macintosh. La actividad proteolítica de las diferentes bandas se calculó como porcentaje de la actividad medida en las bandas del control. Los geles de acrilamida se tiñeron con un kit para tinción con plata (Bio-Rad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

11.- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL ELUÍDO DEL ENSAYO DE LIGANDOS-PROTEINASA Y DEL LT DE *G. lamblia* EN DOS DIMENSIONES

Para el análisis bidimensional de las proteínas de *G. lamblia* se empleó la técnica descrita por Mendoza-López y cols. (2000). Los geles para isoelectroenfoque se prepararon en tubos capilares sellados con parafilm® en el extremo inferior. La solución para preparar los geles contenía: urea 9.2 M, acrilamida al 4% (p/v), N, N metilen bis- acrilamida 0.2% (p/v), tritón X-100 al 10% (v/v), solución de anfólicas con un intervalo de pH de 3-10 al 1% (v/v), solución de anfólicas con un intervalo de pH de 5-7 al 4% (v/v), persulfato de amonio 0.007% (p/v) y TEMED (N, N, N', N', tetrametilendiamina) al 0.15% (v/v).

Una vez que los geles polimerizaron, los capilares se montaron en una cámara para isoelectroenfoque previamente llenada con solución "overlay", la cual contiene urea y anfolinas (intervalo de pH 5/7 y 3/10), así como azul de bromofenol (Apéndice G) e hidróxido de sodio y se pre-corrieron para permitir la formación del gradiente de pH empleando una solución degasificada de hidróxido de sodio 100 mM en el ánodo y ácido fosfórico 10 mM en el cátodo. Los geles se corrieron a 200V/10 min, 300V/15 min y 400V/15 min. Posteriormente, el eluido del ensayo de ligandos-proteinasa realizado de acuerdo a lo descrito por Alvarez-Sánchez y cols (2000; punto 10), así como el paquete de los parásitos lavados se disolvió en regulador de lisis y se aplicó en la parte superior del gel sobreponiéndole solución "overlay" e hidróxido de sodio. Se realizó una pre-corrída a 500V/10 min y posteriormente a 750V/3.5 h. Después del corrimiento los geles se sacaron de los capilares empleando una jeringa y se equilibraron en una solución reguladora durante 1 h (Apéndice G). En la segunda dimensión las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE como se describió anteriormente sellando las cámaras con agarosa y azul de bromofenol como indicador del frente de corrída. Se aplicó una corriente constante de 120V por gel y concluído el corrimiento, los geles se tiñeron y decoloraron en las condiciones antes mencionadas

12. -CARACTERIZACIÓN DE LA CP90

Una vez llevado a cabo el ensayo de ligandos-proteinasa y habiendo identificado una proteinasa de 90 kDa (CP90), se procedió a caracterizarla.

➤ pH óptimo

Se determinó el valor de pH al cual la CP90 tenía una actividad óptima. El sobrenadante obtenido del ensayo de ligandos se analizó electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10%(p/v) copolimerizado con gelatina al 0.2% (p/v), siguiendo las condiciones de corrimiento previamente descritas. Los geles se incubaron en el amortiguador de acetatos 0.1 M en un intervalo de pH de 3.5-7.0 durante 24 h a 37°C y se observó la actividad proteolítica mediante la tinción de éste.

➤ Temperatura óptima

Con respecto a la determinación del valor óptimo de temperatura, los geles del eluído del ensayo de ligandos-proteinasas se incubaron en amortiguador de acetatos pH 5.5 (valor óptimo de pH) a 4, 25, 34, 37, 42-46°C durante 24 h. Posteriormente se tiñó y se evaluó la actividad de la CP90.

➤ Tipo de proteinasas

Para determinar el tipo de proteinasas(s) al que pertenecía la proteinasas de 90 kDa, los trofozoitos se pre-trataron durante 30 min a 37°C con los inhibidores para proteinasas de tipo cisteína E64 (trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamido-[4-guanidino]-Butano) 1 µM, para tipo cisteína TPCK (L-1-cloro-3-[4-tosilamido]-4-fenil-2-butanona, tosil fenilalanil clorometilcetona) 50 µM, para tipo serina PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro) 250 µM, para proteinasas de tipo metalo: 500 µM 1, 10 fenantrolina, así como PepstatinA (100 µM) para proteinasas de tipo aspártico. Los parásitos pre-tratados se lavaron 8 veces con ASF pH 7.2

frío y el LT obtenido se empleó en el ensayo de ligandos-proteinasas como se describió anteriormente. Los geles una vez teñidos se analizaron por densitometría.

➤ **Activadores**

Se evaluó el efecto de tres activadores de proteinasas de tipo cisteína. Los activadores empleados fueron: ditioneitol (DTT) 1 mM, β -mercaptoetanol al 0.1% (v/v), cisteína 1 mM así como CaCl_2 para constatar que la proteinasa de 90 kDa no era de naturaleza metalo. Los geles se incubaron en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5.5 con cada uno de los agentes activadores y a 37°C en agitación constante.

13.- PRODUCCIÓN DEL SUERO anti-CP90

La CP90 fue purificada a partir de los geles SDS-PAGE co-polimerizados con gelatina. Los fragmentos de gel que evidenciaban a la proteinasa se homogenizaron por completo mecánicamente a través de una jeringa y se utilizaron para inmunizar ratones BALB/c. Los animales fueron inoculados con 0.3 mL de la proteinasa en intervalos de 1 semana, durante 3 semanas. Al final del esquema de inmunización los ratones fueron sangrados por punción cardíaca para la obtención del suero anti-CP90. La reactividad del suero anti-CP90 se analizó mediante inmunoelectrotransferencia (IEF) y ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI). El suero pre-inmune normal de ratón se obtuvo antes de iniciar el esquema de inmunización y se usó en todos los ensayos como control negativo.

14.-OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES CELULARES DE LOS TROFOZOITOS DE *G. lamblia*

Para determinar la localización de la CP90, se obtuvieron las fracciones: membranal (FM), citosólica (FC) y nuclear (FN) de los trofozoitos de *G. lamblia*. Se procedió a sonicar la suspensión de aproximadamente 150×10^6 trofozoitos en ASF pH 7.2 con 6 pulsos de 60s a 12 mA y en ausencia de detergente a temperatura de 4°C, empleando un generador de ultrasonido MSE. Una vez obtenido el LT por sonicación, se centrifugó durante 30 min/4°C a 500 xg. El paquete celular obtenido de esta centrifugación se resuspendió en ASF pH 7.2 y el sobrenadante se ultracentrifugó a 11 000 xg para obtener un segundo paquete celular. Las 3 fracciones obtenidas (membranal, citosólica y nuclear) se analizaron en PAGE-SDS al 10% y se realizó su inmunoelectrotransferencia (IET).

15.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

Para determinar el patrón de reconocimiento antigénico del suero anti- CP90 se empleó la técnica de IET de acuerdo al método descrito por Alvarez-Sánchez y cols. (2000). El LT, así como las diferentes fracciones celulares del parásito, se separaron electroforéticamente de acuerdo a lo descrito anteriormente. Los geles se equilibraron en amortiguador de transferencia (Apéndice J) por 30 min a temperatura ambiente con cambios de solución cada 15 min. La transferencia de proteínas al papel de nitrocelulosa (PNC) se llevó a cabo en una cámara de transferencia Bio-Rad a 100V/1 h/4°C. Después de la transferencia, se cortó la tira del PNC en donde se encontraban transferidos los

marcadores de pesos moleculares pre-teñidos. El resto del papel se bloqueó con una solución de ASF-Albúmina sérica bovina (ASB) al 3% (p/v) a 4°C durante toda la noche. Al terminar el período de incubación se cortó el papel en tiras de 4 mm. Éstas se incubaron toda la noche a 4°C con el suero anti-CP90 a diferentes diluciones (1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500) en ASF-Tween al 0.05% (v/v) en agitación constante. Como controles se incluyeron: suero de ratón pre-inmune y suero contra LT del parásito. Posteriormente, las tiras se lavaron 3 veces durante 10 min con ASF-Tween 20 al 0.005% (v/v), enseguida se adicionó el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:2500 en ASF-Tween 20 al 0.05%. Las tiras se incubaron 3 h/37°C en agitación constante. Posteriormente, se hicieron los lavados descritos con anterioridad y se agregó la solución del sustrato (Apéndice J) dejándose reaccionar durante 10 min y la reacción se detuvo con agua.

16.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Trofozoitos de la cepa WB se fijaron con una mezcla de glutaraldehído al 0.5% (v/v)-formaldehído al 2% (v/v) durante 1 h/25°C, se lavaron con ASF pH 7.2 y se bloquearon con glicina 0.2 M. Posteriormente, los trofozoítos se incubaron por 20 min/4°C con el suero anti-CP90 a las diluciones 1:50 y 1:100 o con el suero pre-inmune de ratón utilizado como control negativo a una dilución de 1:100. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal 3C1C8 a una dilución 1:200. Los parásitos se lavaron con ASF pH 7.2 y se incubaron con un segundo anticuerpo acoplado a FITC, a una dilución 1:50 durante 20 min a 4°C. Al

término de la incubación se lavaron con ASF pH 7.2 y se examinaron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss®).

IV.RESULTADOS

Los trofozoitos de *G. lamblia* secretan proteinasas cuando son cultivados solos o en interacción con células IEC6

Con la finalidad de analizar la secreción de proteinasas por trofozoitos de la cepa WB, los parásitos se cultivaron solos ó en interacción con la células epiteliales IEC6 y los sobrenadantes obtenidos de estos cultivos se analizaron mediante geles PAGE-SDS co-polimerizados con gelatina al 0.2% (p/v), de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en la figura 1.

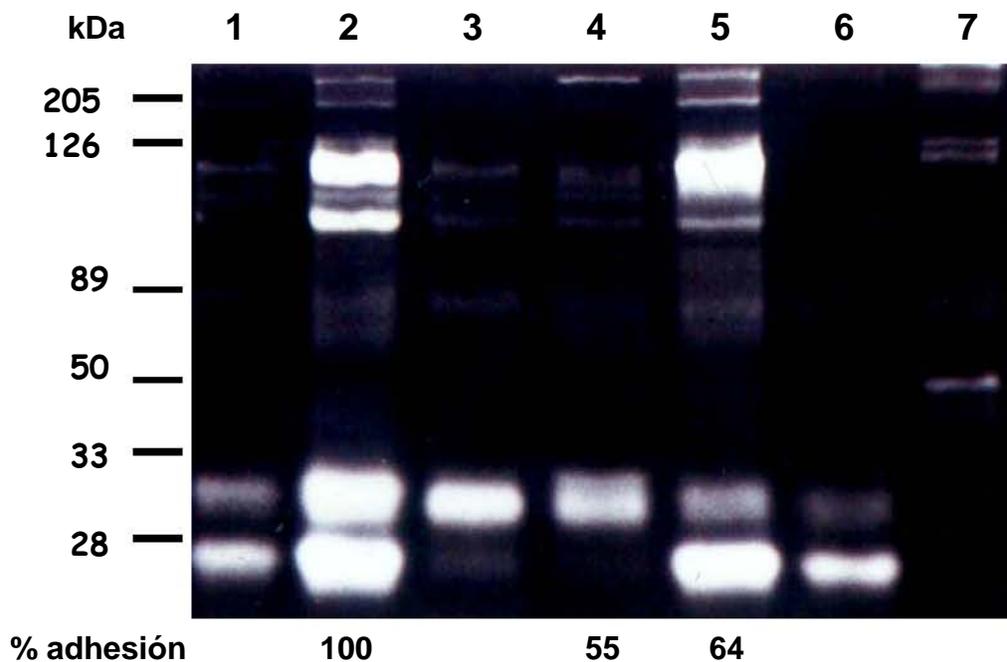


Figura 1. Análisis electroforético de los sobrenadantes de cultivo de trofozoitos solos ó en interacción con las células IEC6. Muestras del medio de cultivo fueron colectadas después de que los trofozoitos se incubaron por 2 h a 37°C en medio, en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de las células IEC6, o bien, después de cultivar las células IEC6 en ausencia de trofozoitos (carril 7). También se analizaron los sobrenadantes de trofozoitos pre-tratados con 50 μ M TPCK (carril 3 y 4) o 1 μ M de E64 (carril 5 y 6), ya sea cultivados solos (carril 3 y 6) o en interacción con células IEC6 (carril 4 y 5). Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como controles expresados en kilodaltones (kDa) se indican a la izquierda de la figura. También se indican los porcentajes de adhesión de los trofozoitos a la línea celular IEC6 con cada una de las condiciones analizadas. Estos resultados son representativos de 2 ensayos.

En el sobrenadante de trofozoitos cultivados solos se detectaron principalmente 7 bandas con actividad proteolítica de pesos moleculares de 198, 135, 120, 107, 73, 20 y 22 kDa (carril 1). Las bandas de 30 y 22 kDa mostraron la actividad mayoritaria. Después de la interacción de los trofozoitos con las células IEC6, las bandas de 135, 107, 30 y 22 kDa aumentaron en 182, 150, 202 y 250%, respectivamente (carril 2). Asimismo se detectaron otras moléculas que no fueron secretadas mayoritariamente, entre ellas una de 88 kDa. Sin embargo, en los sobrenadantes de los trofozoitos pre-incubados con TPCK y cultivados solos (carril 3) o en interacción con la línea celular (carril 4) la mayoría de las proteinasas se inhibieron, excepto la banda de 30 kDa. Por otro lado, en los sobrenadantes de trofozoitos incubados con E64 o cultivados solos (carril 6) las proteinasas se inhibieron o disminuyeron marcadamente, excepto la banda de 22 kDa. Sin embargo, cuando los trofozoitos pre-incubados con E64 se co-incubaron con IEC6 (carril 5) se observó un aumento en la actividad de las bandas de 198 kDa (105%), 135 kDa (200%), 107 kDa (90%) y 22 kDa (120%). La actividad proteolítica de la proteinasa de 30 kDa aumentó en menor proporción (50%). Además, la banda de 88 kDa es bastante evidente y apareció una banda de 180 kDa. Los sobrenadantes del cultivo de las células IEC6 solas revelaron bandas tenues con actividad proteolítica de 213, 194, 149, 139, 73, 48 y 43

kDa (carril 7). Todas las proteinasas excepto la de 73 kDa, no correspondieron con las detectadas en los sobrenadantes de interacción de las células IEC6 con los trofozoitos de WB. Además, las bandas de 198, 135, 120, 107, 30 y 22 kDa se detectaron en los sobrenadantes de cultivo de la interacción o en los parásitos cultivados solos, lo que descarta la posibilidad de que las proteinasas provengan de la línea celular. De manera paralela, se realizaron ensayos de adhesión con trofozoitos incubados con los inhibidores de proteinasas TPCK (50 μ M) y E64 (1 μ M) y en este caso, el porcentaje de adhesión de los parásitos a la línea celular IEC6 fue del 55 y 64% respectivamente, los cuales son significativamente diferentes al control ($P < 0.01$)

Con la finalidad de determinar cuáles otras proteínas diferentes a las proteinasas estaban presentes en los sobrenadantes de cultivo, éstos también se analizaron en geles PAGE-SDS al 10% y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 2). En el sobrenadante de cultivo de línea IEC6 sola (carril 7), se observaron principalmente proteínas de 120, 110, 92 y 86 kDa y en los sobrenadantes de cultivo de los trofozoitos solos, bandas de 162 (doblete), 124, 115, 92, 86, 75, 48 y 41 kDa (carril 1). Las bandas de 162, 124, 115, 75, 48, y 41 kDa parecen ser específicas del trofozoito mientras que la de 92 y 86 kDa son

aparentemente compartidas entre parásitos y línea celular. Después de la interacción (carril 2), aparentemente IEC6 contribuye en menor cantidad con las proteínas secretadas, ya que las proteínas principales o mayoritarias permanecen similares a las de los trofozoitos solos (carril 1). El patrón de proteínas secretadas por los trofozoitos pre-tratados con TPCK cultivados solos o en interacción con la línea celular (carriles 3 y 4 respectivamente), es similar al de la interacción de IEC6 con los trofozoitos no tratados (carril 2), con excepción de la banda de 92 kDa, la que estuvo prácticamente ausente en ambos casos. Este efecto no fue específico para TPCK, ya que en el caso de E64 los trofozoitos secretan un patrón idéntico de proteínas (carril 6). Sin embargo, en el sobrenadante de interacción de los parásitos tratados con E64 y cultivados con IEC6, se observó la proteína de 92 kDa (carril 5). De manera general, a nivel cualitativo, los inhibidores de proteinasas tienen efecto limitado sobre las moléculas secretadas por el parásito sólo ó en interacción con la línea celular IEC6. Sin embargo, estas condiciones inducen importantes cambios cuantitativos en el patrón de proteinasas secretadas.

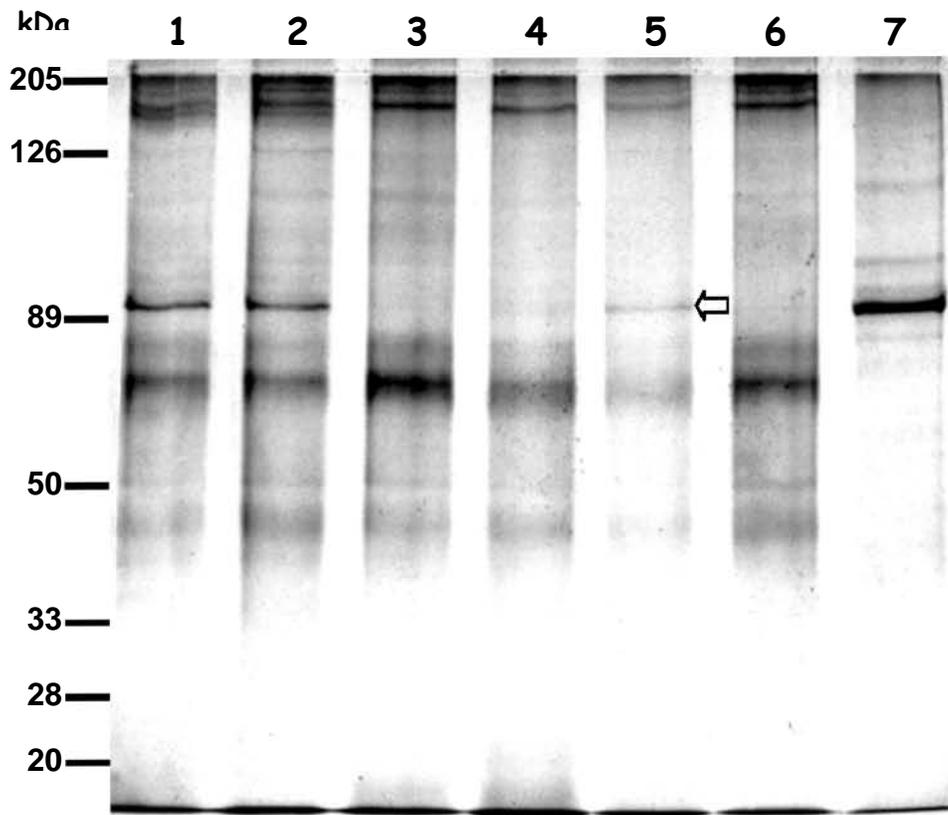


Figura 2. Análisis electroforético de las proteínas presentes en sobrenadantes colectados de trofozoitos cultivados solos ó en interacción con la línea celular IEC6. Los sobrenadantes de cultivo se obtuvieron y procesaron en el mismo orden que en la figura 1. Después de la separación electroforética, el gel se tiñó con un kit de nitrato de plata de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como controles expresados en kilodaltones (kDa) son indicados a la izquierda de la figura. Los resultados son representativos de 2 determinaciones.

Niveles de secreción mayores de una proteinasa de 30 kDa por trofozoitos tratados con TPCK se asocian con daño celular a las células IEC6

En este estudio, 2×10^6 trofozoitos se pre-trataron con E64 ($1 \mu\text{M}$) y TPCK ($50 \mu\text{M}$) y se pusieron en interacción con la línea celular como se describió previamente. Las células IEC6 se caracterizan por formar monocapas confluentes y mostrar una superficie uniforme con uniones funcionales y microvellosidades entre células (Figura 3, panel A). Después de la incubación de los trofozoitos no tratados con los inhibidores por 2 h/ 37°C , las células IEC6 no mostraron daño aparente (Figura 3, panel B). Los trofozoitos se unieron activamente por su disco ventral a las monocapas. En general, la densidad de las microvellosidades no se afectó. Cuando los parásitos pre-tratados con E64 fueron expuestos a IEC6, pocos de ellos se unieron a las monocapas, lo que mostró una densidad de las microvellosidades normal y no afectada (Figura 3, panel C). Sin embargo, cuando se trabajó con 2×10^6 trofozoitos (proporción 4:1:1 a las células IEC6) pre-tratados con TPCK, se observaron importantes alteraciones en las monocapas. Las uniones estrechas aparecieron rotas y muchas células estaban despegadas, además de una distribución alterada de las microvellosidades (Figura 3, panel D). En estos cultivos, las células IEC6

mostraron alteraciones morfológicas (Figura 3, panel D, señalado con flechas) o la formación de protuberancias en la membrana (Figura 3, panel D). Como se esperaba, pocos trofozoitos estaban adheridos a las células y se localizaron en aquellas áreas en donde las uniones celulares estaban rotas.

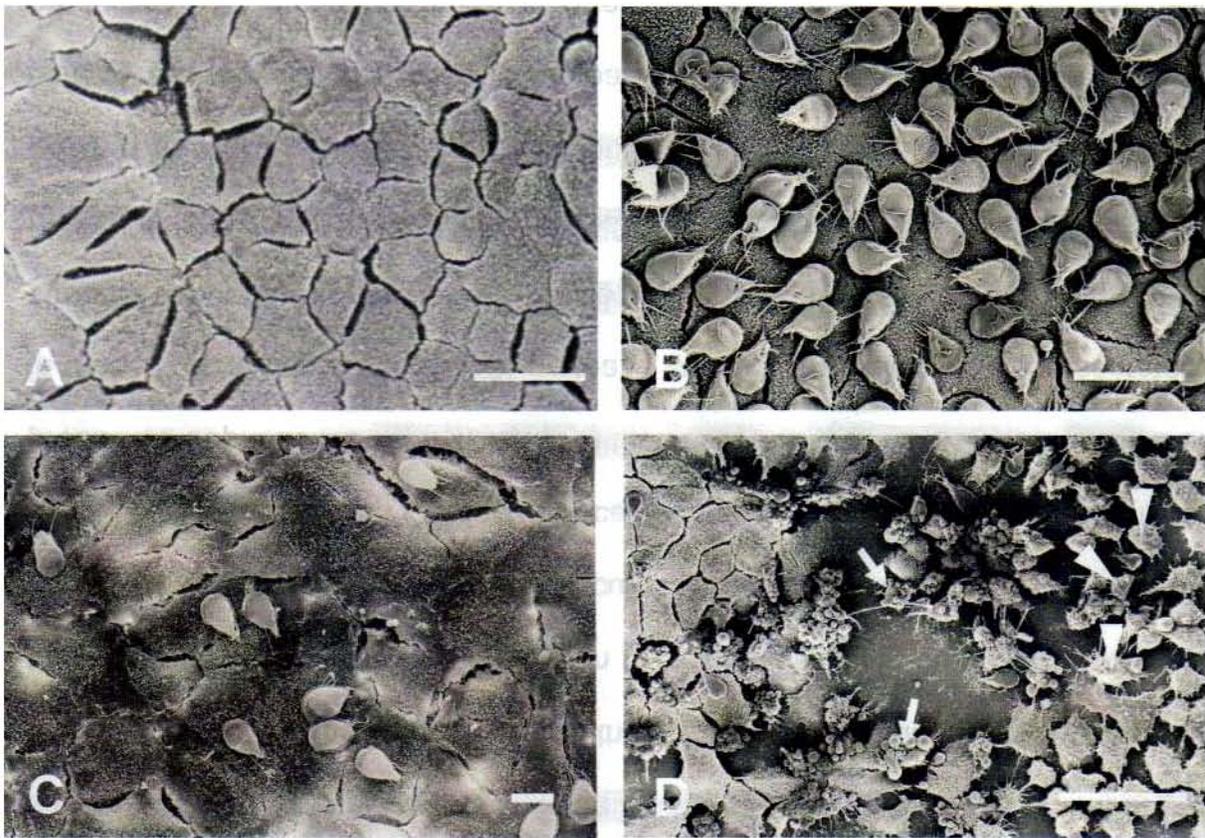


Figura 3. Análisis por microscopía electrónica de barrido de la interacción de trofozoitos de *G. lamblia* con las células IEC6. Monocapa típica de IEC6 (Panel A). 2×10^6 trofozoitos sin tratamiento con inhibidores se cultivaron 2 h/37°C con células IEC6 (Panel B); trofozoitos pre-tratados con E64 (1 μ M) (Panel C) ó con TPCK (50 μ M) (Panel D) en interacción con células IEC6 por 30 minutos a 37°C.

La proteína de 90 kDa de *G. lamblia* que se une a la superficie de las células IEC6, es una cisteína proteinasa

Para la estandarización de las condiciones experimentales del ensayo de ligandos-proteinasa, inicialmente se utilizaron dos diferentes detergentes para la obtención del LT: tritón X-100 y desoxicolato de sodio (DOC) al 10%(v/v). En la figura 4 (carril 2), se puede observar que el LT obtenido con DOC al 10%(v/v) contiene mayor número de componentes, por lo que este detergente se eligió para la obtención del LT. Por otro lado, en el ensayo de ligandos-proteinasa, se usaron 1×10^6 células IEC6 fijadas y se evaluó el LT de obtenido con DOC de diferentes cantidades de trofozoitos: 40, 60 y 80×10^6 (Figura 4, carriles 4-6). El LT obtenido a partir de 80×10^6 trofozoitos permitió una mejor detección de una banda con actividad proteolítica de 90 kDa (Figura 4, carril 6).

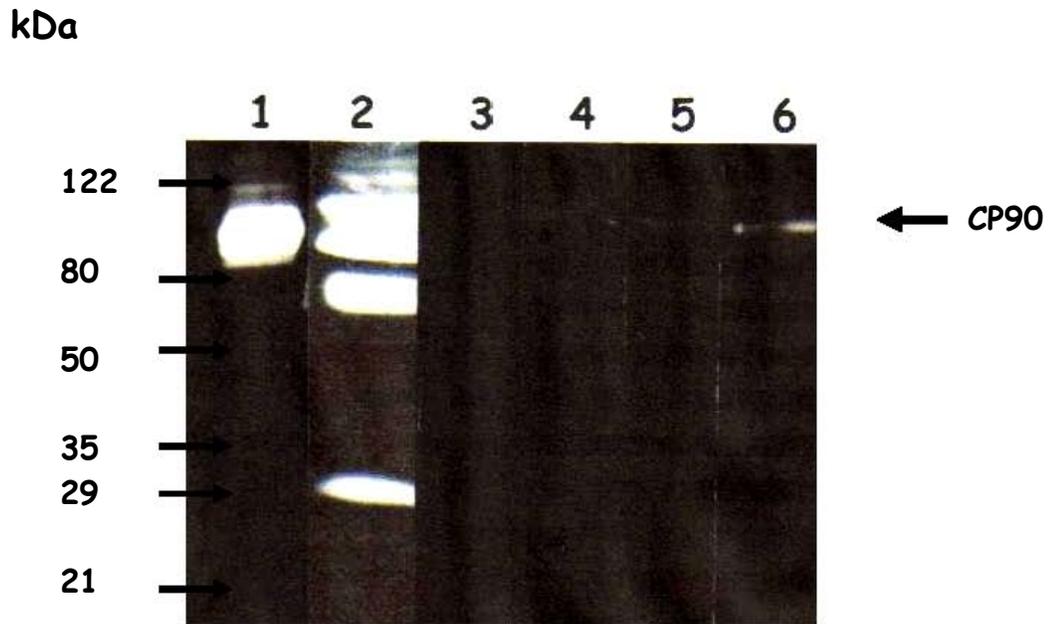


Figura 4. Análisis electroforético de la actividad de proteinasas obtenidas con el ensayo de ligandos-proteinasa. En la estandarización de las condiciones experimentales del ensayo de ligandos-proteinasa se evaluó el uso de Tritón X-100 (carril 1) y de DOC al 10% (carril 2) para la obtención del LT de los trofozoitos de *G. lamblia*, así como el empleo del LT obtenido de 40 , 60 y 80×10^6 trofozoitos (carriles 4-6). En el ensayo se utilizaron 1×10^6 células IEC6 fijadas. Los valores de pesos moleculares de las proteínas empleadas como controles se indican a la izquierda de la figura en kilodaltones (kDa). En el carril 3 se incluyó el sobrenadante de la línea celular IEC6 fijada. La flecha a la derecha de la figura indica la presencia de la proteinasa detectada.

Caracterización de la CP90

Para determinar el tipo de proteínasa al que pertenecía la CP90, los trofozoitos fueron pre-tratados con los inhibidores de proteínasas: E64 (0.01mM) (cisteína-proteínasas), PMSF (0.25 mM), TPCK (0.05 M) (cisteína y serina-proteínasas), 1,10-fenantrolina (0.5 mM)(metalo-proteínasas), así como Pepstatin A (0.1 mM) (proteínasas de tipo aspártico). Los parásitos se incubaron por 30 min a 37°C. Con el LT obtenido se realizaron los ensayos de ligandos-proteínasa y el eluído de éstos se analizó en geles SDS-PAGE co-polimerizados con gelatina al 0.2% (p/v) (Figura 5). Los geles se analizaron por densitometría y los porcentajes de inhibición de la actividad proteolítica con cada uno de estos inhibidores se calculó (Tabla 1). E64 y TPCK fueron los inhibidores que mayor efecto tuvieron sobre la proteínasa de 90 kDa (60 y 38%, respectivamente) ($P > 0.05$).

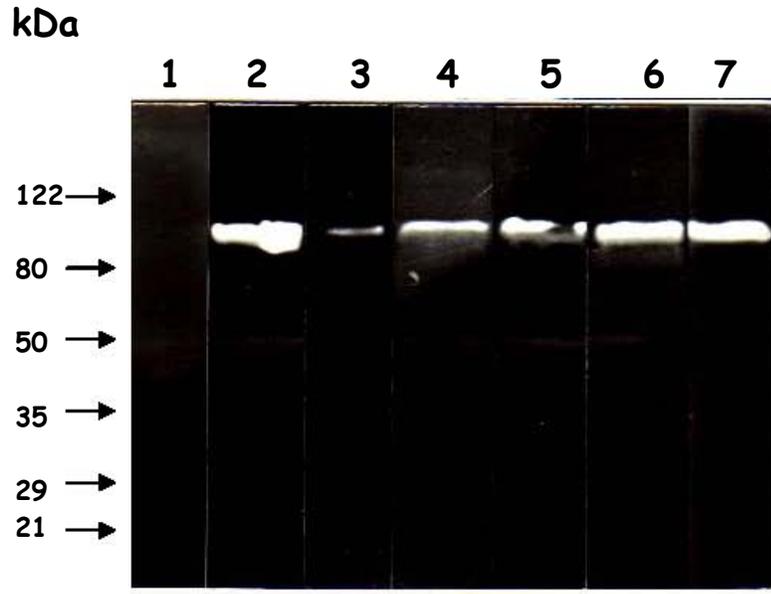


Figura 5. Análisis electroforético de la actividad de la proteinasa de 90 kDa obtenida en los ensayos de ligandos-proteinasa en presencia de diferentes inhibidores de proteinasas. En el ensayo de ligandos-proteinasa se emplearon 1×10^6 células IEC6 fijadas y el LT de 80×10^6 parásitos pre-tratados por 30 min a 37°C con diferentes inhibidores de proteasas: E64 (carril 3), PMSF (carril 4), TPCK (carril 5), 1,10 fenantrolina (carril 6), Pepstatin A (carril 7). Como control de interacción se incluyó el eluido obtenido de parásitos sin inhibidores (carril 2). Sobrenadante de la línea celular sola (carril 1). Los marcadores de pesos moleculares de las proteínas empleadas como controles se indican a la izquierda de la figura, expresados en kilodaltones (kDa). Los resultados mostrados son representativos de 5 experimentos.

Tabla 1. Inhibición (%) de la actividad proteolítica de CP90 con inhibidores específicos de proteinasas

Inhibidor	Concentración (mM)	% Inhibición \pm DE
E64	0.01	60 \pm 3.0
PMSF	0.025	20 \pm 3.0
TPCK	0.05	38 \pm 2.0
1,10 fenantrolina	0.5	3 \pm 0.5
Pepstatin A	0.1	2 \pm 0.1

La proteinasa de 90 kDa es una cisteína proteinasa (CP90) que es activada por agentes reductores

Con la finalidad de confirmar el tipo de proteinasa de CP90, se procedió a emplear activadores de cisteína-proteinasa, como son ditioneitol (DTT) 1 mM y β -mercaptoetanol (0.1%) (v/v) (Figura 6). Con ambos activadores se observó una activación de CP90, aunque la mayor activación se obtuvo con β -mercaptoetanol. Cuando se empleó cisteína 0.1 mM, se observó una actividad similar a la obtenida con los agentes antes mencionados. Asimismo, el uso de cloruro de calcio (CaCl_2) 1 mM, el cual sirve para activar proteinasas de tipo metalo no

tuvo efecto sobre la actividad de CP90 (Figura 6). Al emplear los diferentes activadores, se hizo evidente la presencia de dos bandas con actividad proteolítica, sólo en este caso se apreció la aparición de otra banda de aproximadamente 88 kDa.

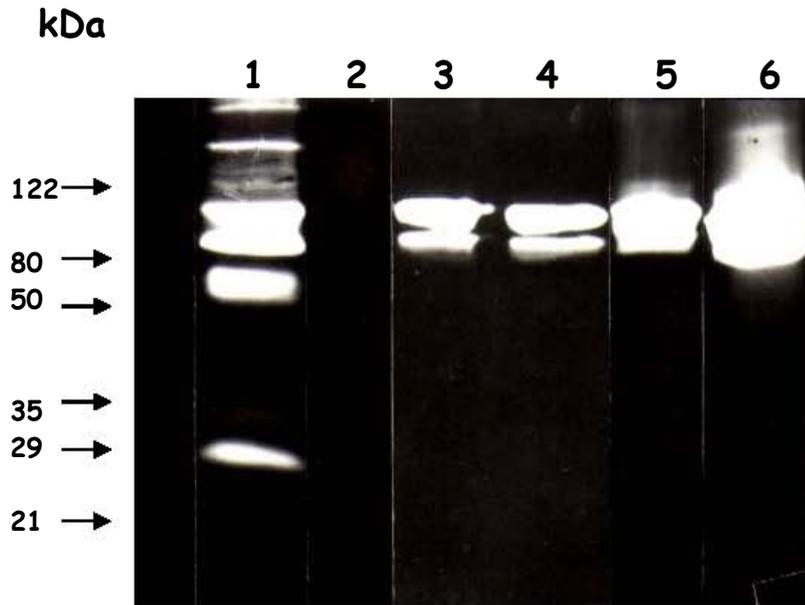


Figura 6. Análisis electroforético de la actividad de la proteinasa de 90 kDa obtenida en los ensayos de ligandos-proteinasa en presencia de diferentes activadores. El eluído obtenido en los ensayos de ligandos-proteinasa se separó electroforéticamente y se cortaron los diferentes carriles. Los carriles se incubaron con cisteína 0.1mM (carril 3), CaCl₂ 1 mM (carril 4), DTT 1 mM (carril 5), β-mercaptoetanol 0.1% (carril 6). También se analizaron el LT en ausencia de agentes activadores (carril 1) y el eluído de la línea celular IEC6 (carril 2). Los valores de pesos moleculares de proteínas empleadas como controles se indican a la izquierda de la figura, expresados en kilodaltones (kDa). Los resultados mostrados son representativos de 8 ensayos.

Determinación de pH y temperatura óptima para la actividad de CP90

La actividad de la CP90 se evaluó bajo diferentes valores de pH y temperatura. Para este propósito, el eluido obtenido de los ensayos de ligandos-proteinasas, se analizó electroforéticamente y los geles se incubaron a diferentes valores de pH (3.5-7.0) a 37°C (Figuras 7 y 9). En el caso de la temperatura, los geles se incubaron en amortiguador de acetatos pH 5.5, a diferentes temperaturas (4, 25, 34, 37, 42-46°C)(Figura 8 y 10). Los resultados muestran que la CP90 tiene actividad a pH 4.5-6.5, con un máximo a 5.5. No se observó actividad en valores de pH por debajo de 4.0. En lo que a temperatura se refiere, la actividad detectada a 4°C y 25°C fue muy baja, mostrando aumento a 34°C y siendo óptima a 37°C. A 42°C se detectó actividad comparable al caso anterior; sin embargo, en el valor de 46°C no se detectó actividad alguna.

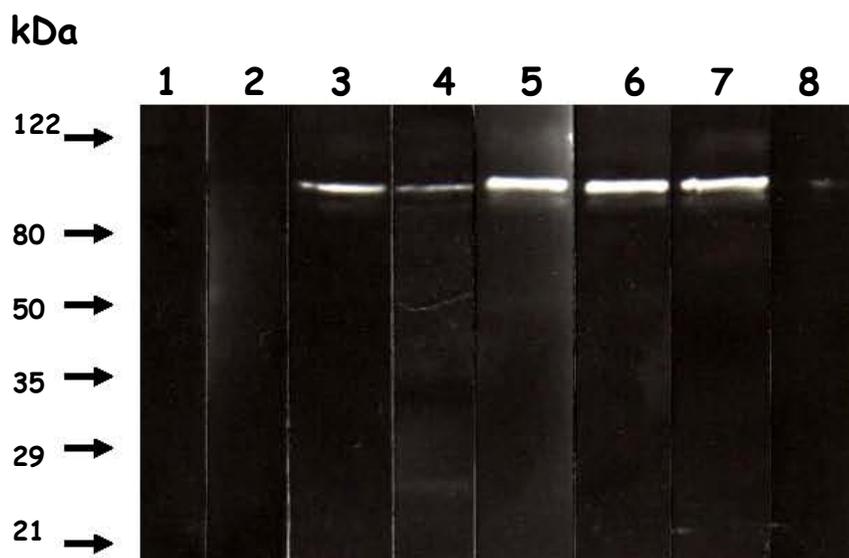


Figura 7. Análisis electroforético de la actividad de CP90 obtenida en ensayos de ligandos-proteinasa a diferentes valores de pH. El eluido obtenido de los ensayos de ligandos-proteinasa se separó electroforéticamente y los geles se incubaron a 37°C a pH 3.5 (carril 2); pH 4.5 (carril 3), pH 5.0 (carril 4), pH 5.5 (carril 5); pH 6.0 (carril 6); pH 6.5 (carril 7); pH 7 (carril 8). Se incluyó como control el eluido de la línea celular IEC6 (carril 1). Los valores de peso molecular de las proteínas empleadas como controles se señalan a la izquierda de la figura, expresados en kilodaltones (kDa).

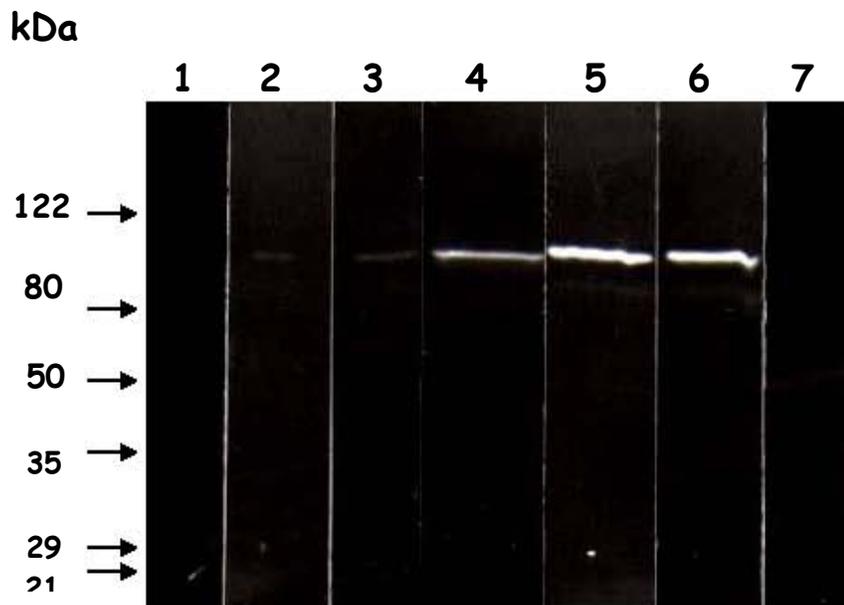
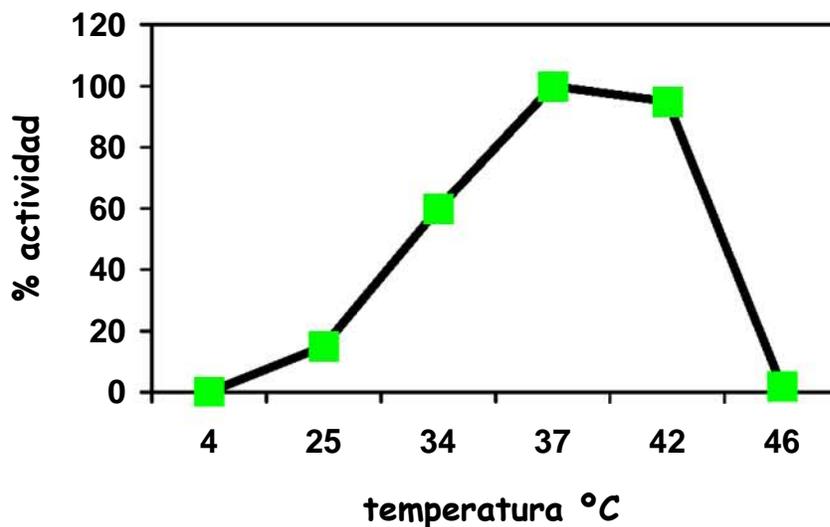
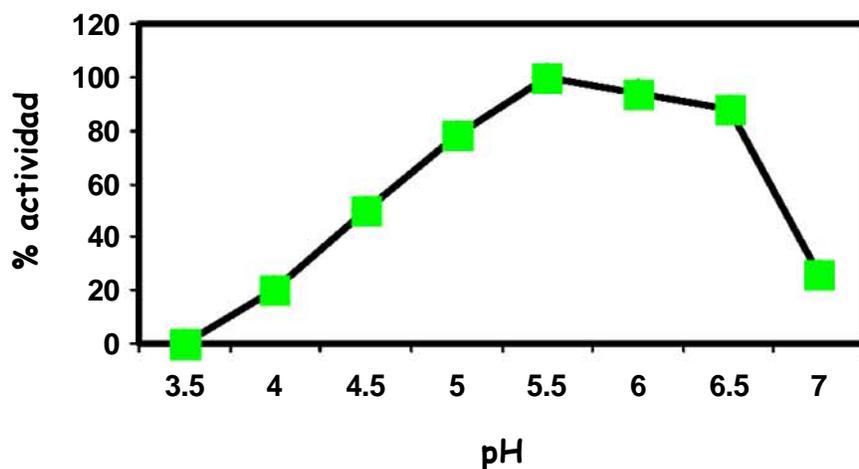


Figura 8. Análisis electroforético de la actividad de CP90 obtenida en ensayos de ligandos-proteinasa a diferentes valores de temperatura. El elúido obtenido de los ensayos de ligandos-proteinasa se separó electroforéticamente y los geles se incubaron a pH 5.5 y diferentes temperaturas: 4°C (carril 2); 25°C (carril 3); 34°C (carril 4); 37°C (carril 5); 42°C (carril 6); 46°C (carril 7). Se incluyó como control el elúido de la línea celular IEC6 (carril 1). Los valores de peso molecular de las proteínas empleadas como controles se señalan a la izquierda de la figura, expresados en kilodaltones (kDa).



Figuras 9 y 10. Efecto de los diferentes valores de pH (figura 8) y de temperatura (figura 9) en la actividad de CP90. El porcentaje de actividad proteolítica se determinó por análisis densitométrico de los zimogramas de CP90 presentados en las figuras 7 y 8.

La CP90 también degrada IgG e IgA

Se investigó si la CP90 era capaz de degradar una variedad de sustratos como: mucina bacteriológica, inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgAs) así como también hemoglobina. La gelatina fue usada como un control (Figura 11). Se observó que la actividad de la CP90 es selectiva en diferentes sustratos naturales, siendo capaz de degradar a la IgG e IgA, pero no tiene actividad sobre IgAs, mucina y hemoglobina bajo las condiciones empleadas.

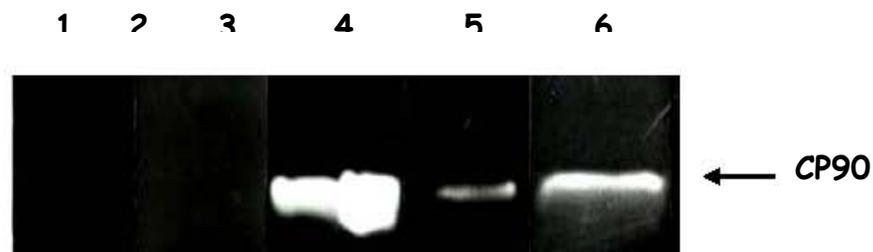


Figura 11. Análisis electroforético de la actividad de CP90 obtenida en ensayos de ligandos-proteinasa usando como sustratos diferentes proteínas. Carril 1. Mucina al 0.2% (p/v); carril 2: Hemoglobina al 0.2% (p/v); carril 3: IgAs; carril 4: Gelatina al 0.2% (p/v); carril 5: IgA (1.5 mg); carril 6: IgG (1.5 mg). Todos los gels con sustrato se activaron bajo las mismas condiciones experimentales (24 h/37°C/pH 5.5).

La CP90 tiene un pI de 6.8 y no presenta isoformas

Se llevó a cabo el análisis en doble dimensión del LT del parásito (Figura 12 A) y del eluído obtenido del ensayo de ligandos-proteinasa (Figura 12 B). En la región que corresponde a la CP90 únicamente se detectó una mancha con pI de 6.8 (Figura 12 B)

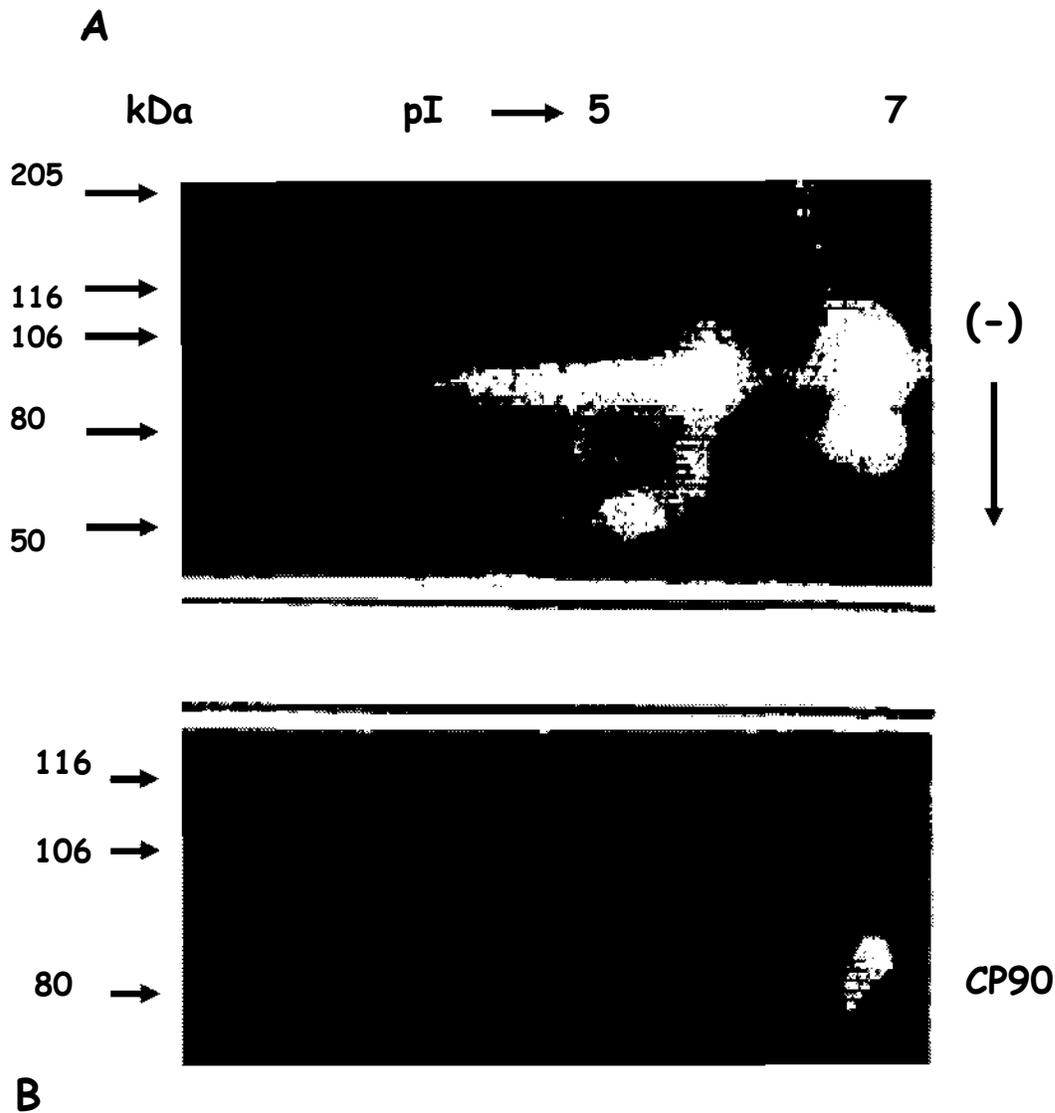


Figura 12. Análisis electroforético co-polimerizado con gelatina en dos dimensiones de las proteinasas presentes en el LT de *G. lamblia* (A) y en

el eluido obtenido del ensayo de ligandos (CP90) (B). Los marcadores de peso molecular se indican en kilodaltones (kDa). La flecha de pI muestra la dirección del isoelectroenfoque usando anfollnas 3/10 y 5/8(-) muestra la dirección de la electroforesis por peso molecular. La flecha de la figura B indica la posición de la mancha correspondiente a la actividad proteolítica de la CP90.

La CP90 se localiza mayoritariamente en la fracción membranal de los trofozoitos de *G. lamblia*

Con la finalidad de determinar la localización celular de la CP90, inicialmente se obtuvieron diferentes fracciones celulares de los trofozoitos de la cepa WB (plasmática, citosólica y nuclear) y se analizaron en geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina 0.2% (p/v) (Figura 13). La CP90 fue detectada mayoritariamente en la fracción membranal, en la fracción citosólica también se detectó la presencia de la CP90, aunque con menor intensidad. En la fracción nuclear no se observó la CP90.

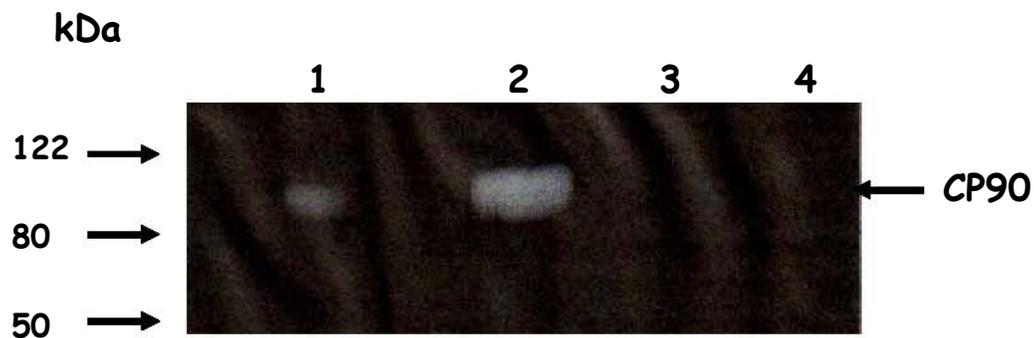


Figura 13. Análisis electroforético de las fracciones celulares enriquecidas de *G. lamblia*. La fracción membranal (carril 2), citosólica (carril 3) y nuclear (carril 4) así como el LT (carril 1) de los trofozoitos se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, copolimerizados con gelatina 0.2%. Los valores de peso molecular de las proteínas empleadas como controles se señalan a la izquierda de la figura, expresados en kilodaltones (kDa).

La localización celular de la CP90 también se verificó por IET empleando las fracciones celulares obtenidas del parásito y el suero anti-CP90 (Figura 14). Como se puede observar, la CP90 es reconocida por el suero anti-CP90 de manera mayoritaria en la fracción membranal (carril 3), así como otras proteínas de 75 y 60 kDa, también es posible observar en la fracción citosólica el reconocimiento de estas mismas proteínas aunque con menor intensidad (carril 2). En la fracción nuclear (carril 4) no se observó ninguna proteína reconocida, así como tampoco en el suero pre-inmune (carril 5). Con respecto al LT (carril 1) se observó que hay un reconocimiento de 4 bandas de peso molecular de 90, 75, 60 y 20 kDa, aunque esta última casi es imperceptible. Sin embargo, de manera predominante se observa el reconocimiento de CP90 en membrana, lo que corrobora la localización celular de esta proteína.

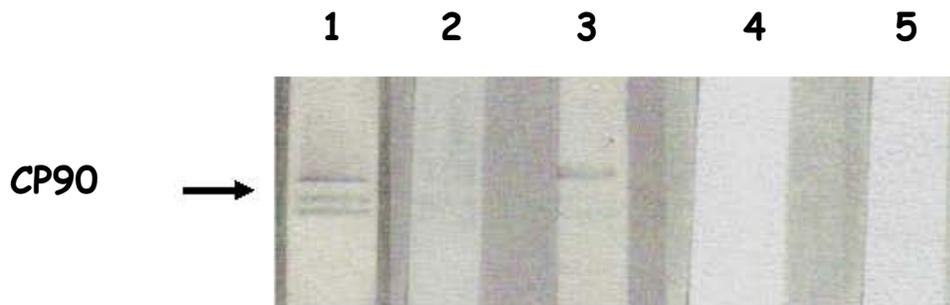
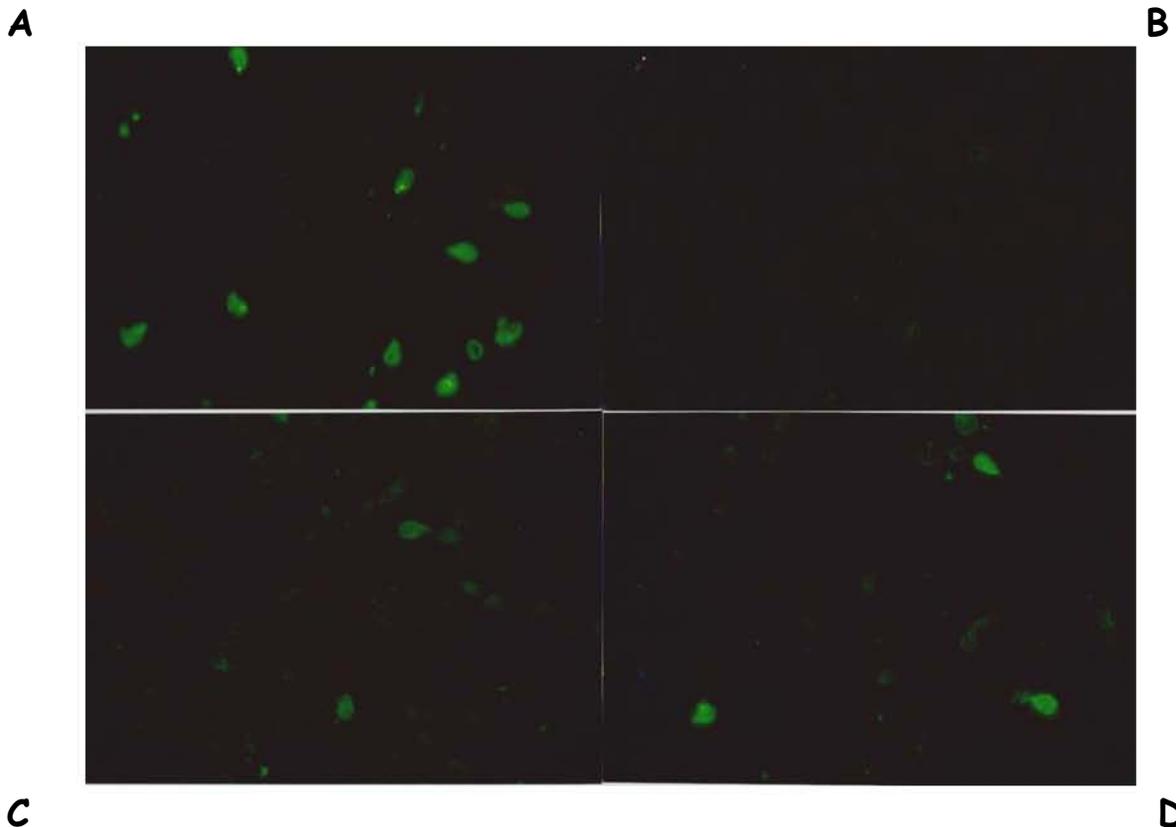


Figura 14. Inmunoelctrotransferencia de diferentes fracciones celulares obtenidas de trofozoitos de *G. lamblia*. Las fracciones celulares y el LT se separaron electroforéticamente, se transfirieron a PNC y éste se incubó con el suero anti-CP90 a una dilución 1:100. La dilución empleada para el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa fue 1:2500. LT (carril 1); fracción citosólica (carril 2); fracción membranal (carril 3); fracción nuclear (carril 4); suero pre-inmune (carril 5). La flecha indica a la CP90.

La CP90 se localiza en la membrana de los trofozoitos de *G. lamblia*

Para investigar la localización de CP90 en trofozoitos completos se llevaron a cabo ensayos de IFI en parásitos fijados utilizando el suero anti-CP90 (Figura 15, panel C Y D). Este análisis evidenció la localización de CP90 en la superficie del trofozoito, al igual que en los trofozoitos que se incubaron en presencia del anticuerpo monoclonal 3C1C8 (Figura 15, panel A), el cual se usó como control positivo, ya que tiene un reconocimiento en forma de parche a lo largo de la superficie

del trofozoito. Con respecto al control negativo (trofozoitos con suero pre-inmune) no se observó reconocimiento de la superficie del parásito (Figura 15, panel B).



C **D**
Figura 15. Fotomicrografías de trofozoitos de *G. lamblia* fijados con formaldehído y no permeabilizados analizados por inmunofluorescencia indirecta. El panel A y B corresponden a los controles, control positivo: anticuerpo monoclonal 3C1C8 y el control negativo: suero pre-inmune de ratón, respectivamente. En el panel C y D se utilizó el suero anti-CP90 1:50 y 1:100, respectivamente. Las muestras fueron analizadas en un microscopio (Zeiss®) para fluoresceína a un aumento de 40X.

V. DISCUSIÓN

En parasitosis como trichomoniasis y amoebiasis se ha demostrado la participación de proteinasas en el proceso de adhesión (Arroyo y Alderete, 1989; Rodríguez y cols., 1994; Arroyo y Alderete, 1995; García-Rivera y cols., 1999; Mendoza-López y cols., 2000). La adhesión de *G. lamblia* a las células intestinales es un evento de gran relevancia en la patogénesis de la giardiosis. Existen múltiples reportes de las actividades de proteinasas en la cepa P1 de *G. lamblia*, predominantemente del tipo cisteína, serina y aspártico (Williams y Coombs, 1995). Además, se ha detectado actividad proteolítica en productos de excreción/secreción de trofozoitos de la cepa P1 y se ha relacionado con daño al epitelio intestinal (Jiménez y cols., 2000; Jiménez y cols., 2004), pero no se han relacionado con el proceso de adhesión del parásito.

Por otro lado, estudios realizados por nuestro grupo de investigación con la cepa WB de *G. lamblia* han demostrado la presencia de cisteína, serina y metalo proteinasas en el LT de trofozoitos del parásito y de manera importante la posible participación de éstas en la adhesión del parásito a células epiteliales (Rodríguez-Fuentes, 1998). La presencia de proteinasas de tipo aspártico en la cepa WB, a diferencia de lo encontrado con la cepa P1, no ha sido demostrada. Estos resultados se han visto reforzados en el Proyecto del Genoma de *Giardia* basado en la cepa WB, en donde se han reportado hasta 23 genes bien caracterizados para proteinasas del tipo cisteína, mientras que los marcos de lectura abierta deducidos

para otras proteinasas predican únicamente proteinasas del tipo serina y metalo, pero no del tipo aspártico.

Considerando estos hallazgos, y con la finalidad de continuar el estudio de la participación de las proteinasas de la cepa WB de *G. lamblia* en la adhesión a células epiteliales, en este trabajo de tesis nos enfocamos inicialmente a evaluar la secreción de proteinasas por trofozoitos de la cepa WB, cultivados solos ó en interacción con las células epiteliales IEC6, así como el efecto de inhibidores específicos de proteinasas en la secreción y adhesión de los trofozoitos a células epiteliales IEC6. Además, se caracterizaron proteinasas del parásito que reconocen la superficie de las células IEC6, empleando para esto el ensayo de ligandos-proteinasas.

En este trabajo se detectó la secreción de proteinasas por los trofozoitos de la cepa WB de *G. lamblia*. Cabe mencionar que los pesos moleculares determinados para las proteinasas intracelulares de la cepa WB (160, 110, 100, 95, 74, 60 y 19 kDa) son diferentes a los de las proteinasas secretadas mayoritariamente (198, 135, 120, 107, 73, 30 y 22 kDa), sugiriendo que algunas de estas proteinasas intracelulares podrían ser procesadas antes de que sean secretadas, como se ha reportado recientemente en el parásito *E. histolytica* (Nowak y cols., 2004). Nuestros hallazgos son consistentes con las observaciones de otros estudios en los que se ha detectado actividad proteolítica en productos de excreción/secreción de trofozoitos de la cepa P1 (Jiménez y cols., 2000; Jiménez y cols., 2004). Además, por primera vez se demostró que la interacción de los trofozoitos con las células

epiteliales IEC6, resulta en un aumento en la secreción de algunas de las proteinasas (135, 107, 30 y 22 kDa) del parásito. La secreción de estas proteinasas mayoritarias se vió inhibida completa ó parcialmente cuando los trofozoitos fueron pre-tratados con TPCK y E64, con excepción de las proteinasas de 30 y 22 kDa, respectivamente. Un aspecto de gran relevancia es lo observado en los ensayos de adhesión cuando los trofozoitos fueron pre-tratados con TPCK y E64. En este caso, la adhesión del parásito a las células IEC6 fue de 55 y 64% respectivamente. Cuando se investigó la secreción de moléculas diferentes a las proteinasas que se vieran afectadas cuando los trofozoitos fueron pre-tratados con E64 y TPCK e interaccionaron con las células IEC6, no se observaron cambios relevantes en las proteínas secretadas en los geles teñidos con plata. Considerando lo anterior, la asociación entre la inhibición de la adhesión de los trofozoitos tratados con los inhibidores antes mencionados y la inhibición respectiva de las actividades proteolíticas predominantes en los sobrenadantes de esta interacción sugiere que las proteinasas secretadas participan en la adhesión del parásito a las células epiteliales.

A este respecto, existen diversos estudios que han demostrado la participación de proteinasas en la adhesión a las células blanco en otros parásitos protozoarios. Así el empleo de los inhibidores TPCK, TLCK (inhiben proteinasas del tipo cisteína y serina) y leupeptina (inhibidor de proteinasas del tipo cisteína) ha mostrado una disminución en la adhesión de la citoadherencia de *T. vaginalis* a líneas celulares epiteliales vaginales humanas y HeLa (Arroyo y Alderete, 1989). Así también, estudios realizados por Arroyo y Alderete (1995) y por Mendoza-

López y cols. (2000) demostraron que una proteínasa de tipo cisteína de 30 kDa está involucrada en la citoadherencia de *T. vaginalis* a las células epiteliales. Del mismo modo se ha sugerido que una cisteína-proteínasa de 112 kDa podría jugar un papel en la adhesión de *E. histolytica* a la célula blanco, en este caso eritrocitos de humano (Rodríguez y cols., 1994; García-Rivera y cols., 1999).

Debido a que la estimulación de la secreción de proteinasas por el parásito cuando interactúa con las células IEC6 es de gran interés, en nuestro grupo de investigación se han realizado estudios orientados a identificar componentes de las células epiteliales que sean los responsables de esta estimulación. Resultados preliminares indican que cuando los trofozoitos de *G. lamblia* se cultivan en presencia de una fracción de citosol enriquecida procedente de la línea celular MDCK, su secreción de proteinasas aumenta, mientras que con las fracciones enriquecidas de membrana no sucede así (datos no mostrados). Es importante que se continúe con la identificación y caracterización de la(s) molécula(s) de la fracción citosólica de las células epiteliales responsables de esta estimulación.

Por otro lado, se observó daño celular de las IEC6 incubadas con los trofozoitos pre-tratados con TPCK. Resulta importante resaltar que en los sobrenadantes de estas interacciones, la proteínasa de 30 kDa no fue inhibida con TPCK y fue secretada mayoritariamente. A diferencia de lo anterior, las células IEC6 incubadas con los trofozoitos pre-tratados con E64, no sufrieron daño celular, y en este caso la proteínasa de 30 kDa no fue detectada en los sobrenadantes de interacción. Por lo anterior, nuestras observaciones sugieren la participación de la

proteínasa de 30 kDa en el daño celular. A este respecto, se ha demostrado la presencia de proteínasas de tipo cisteína en productos de excreción/secreción de la cepa P1 y se ha sugerido su posible participación en el daño a la mucosa (Jiménez y cols., 2000; Jiménez y cols., 2004). Sin embargo, el daño que fue observado en las células IEC6 no necesariamente está asociado con la adhesión del parásito y podría estarlo con la secreción de otras moléculas. A este respecto, se ha reportado una proteína de 58 kDa presente en productos de excreción/secreción con actividad enterotóxica en trofozoitos de la cepa P1 de *G. lamblia* (Kaur y cols., 2001). Sin embargo, en nuestro estudio esta molécula no fue observada en los geles SDS-PAGE de sobrenadantes de trofozoitos pre-tratados con TPCK en interacción con IEC6 teñidos con nitrato de plata. La expresión de esta molécula podría ser dependiente de la cepa en estudio. Además, es posible que el daño celular observado en este estudio, pudiera deberse a la presencia de moléculas diferentes a la de 58 kDa.

Para confirmar que la proteínasa de 30 kDa es la responsable de la citotoxicidad observada son necesarios más estudios, como por ejemplo, producción de anticuerpos e inhibición total de la misma y posterior evaluación del daño a la célula. Si tomamos en cuenta que E64 no penetra de manera efectiva las membranas celulares (Wilcox y Mason., 1992) y el hecho de que sólo hay una inhibición parcial de la proteínasa de 30 kDa, sugiere que ésta, se encuentra parcialmente localizada en la superficie del trofozoito.

Una vez que se demostró que los trofozoitos secretaban proteínasas de tipo cisteína y su participación en la adhesión a las células IEC6, resultó de interés,

evaluar si alguna(s) molécula(s) con actividad proteolítica presente(s) en el LT de los trofozoitos, reconocía(n) la superficie de las células epiteliales IEC6. Para esto, se empleó el ensayo de ligandos-proteinasas, el cual ha sido utilizado ampliamente como una herramienta para seleccionar proteínas involucradas en la interacción hospedero-parásito como son proteinasas y/o adhesinas (Arroyo y Alderete, 1989; Arroyo y cols., 1992; Provenzano y Alderete, 1995; Mendoza-López y cols., 2000; Alvarez-Sánchez, 2000; Hernández-Gutiérrez, 2004). La especificidad del ensayo ha sido cuestionado (Addis y cols., 2000), sin embargo, el estudio realizado por Hernández-Gutiérrez y cols. (2004), en el que se identificó una proteinasa de 39 kDa empleando este ensayo, demostró la especificidad de éste al usar diferentes tipos celulares (células HeLa, VEC's, DU-145 y CaCo-2).

Mediante el ensayo de ligandos-proteinasas fue posible la identificación de una proteinasa de 90 kDa de la cepa WB de *G. lamblia* que reconoce la superficie de las células epiteliales IEC6. La caracterización posterior de la proteinasa demostró que se trata de una proteinasa de tipo cisteína (CP90), con actividad óptima a pH 5.5 y temperatura de 37°C, condiciones que se pueden encontrar en el segmento de intestino (duodeno-yeyuno) que parasita *G. lamblia*. Así, el pH puede ser una señal reguladora del medio ambiente para la actividad de esta molécula como se ha observado en *Candida albicans* (Bernardis y cols., 1998).

Además, se determinó por geles en 2D un pI de 6.8 para la CP90. Con respecto a la degradación de diferentes sustratos, un aspecto interesante de resaltar es que este parásito no es invasivo, por lo que efectivamente no se esperaba la

degradación de sustratos como hemoglobina. Sin embargo, la CP90 mostró actividad sobre IgG e IgA, por lo que podría participar de manera importante en la relación hospedero-parásito durante el proceso de infección, a través de la evasión de la respuesta inmune dirigida contra el parásito (Stager y cols., 1997; Stager y Mûller, 1997; Mûller,y Gottstein, 1998; Bienz y cols., 2003).

Los resultados obtenidos en el ensayo de ligandos-proteinasas sugieren la localización de la CP90 en la superficie de los trofozoitos, lo cual se demostró en los ensayos de IET realizados con las fracciones celulares enriquecidas obtenidas del parásito, en los cuales se detectó la mayor reactividad en la fracción membranal. Además, los ensayos de IFI con el suero anti-CP90, proveen de resultados concluyentes acerca de la localización de la CP90 en la superficie de *G. lamblia*. Cabe mencionar que en los ensayos de IFI, no todos los parásitos analizados reaccionaron con el suero anti-CP90. La heterogeneidad de la expresión de la CP90 se puede deber a que se encuentra bajo variación fenotípica (Nash y cols., 1992), la cual podría depender de las fases del ciclo celular o regulación del medio ambiente. Alternativamente, diferentes etapas de maduración de la proteinasas (pre-pro CP90, pro-CP90 o CP90) podrían influir o afectar la translocación de la CP90 madura a la membrana del parásito.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel de las proteinasas de los parásitos en el proceso de adhesión a la célula blanco. Entre éstas se incluye: el desenmascaramiento de receptores putativos en la membrana ya sea del trofozoito o de la célula epitelial, como se ha sugerido en el caso de *T. vaginalis*

(Arroyo y Alderete, 1989). Alternativamente, las proteinasas podrían jugar un papel en la degradación de mucina, facilitando de esta manera la adhesión de los parásitos a las células blanco o la motilidad del parásito (Paget y James., 1994). El mecanismo preciso por el que las proteinasas de *G. lamblia* están participando en el proceso de adhesión requiere de estudios posteriores.

Es de interés mencionar que una proteinasa de alrededor de 88 kDa fue detectada en los sobrenadantes de interacción de los trofozoitos con las células IEC6 y aunque no fue mayoritariamente secretada, está presente en los sobrenadantes de interacción de los trofozoitos con las IEC6. Aún cuando no se puede concluir que se trata de la CP90 detectada en los ensayos de ligandos-proteinasa, es probable que sea así, si consideramos que con análisis electroforético en 2D no se evidenciaron isoformas de la CP90. De ser la misma molécula, resulta de interés que la CP90, además de unirse a la superficie de las células blanco sea secretada por el parásito. Para definir este aspecto, es necesario realizar un análisis electroforético en 2D de los sobrenadantes de interacción para caracterizar a la molécula, además de la purificación y secuenciación de estas dos moléculas permitiría determinar su homología. La secuenciación de CP90 permitirá además analizar su similitud con algunas proteinasas ya reportadas de otros parásitos que participan en el proceso de adhesión.

Por otro lado, considerando la importancia de la CP90 en cuanto a su reconocimiento por moléculas de superficie de las células epiteliales y a su

localización en la superficie del parásito, sería igualmente importante determinar su inmunogenicidad. Para esto, se podrían utilizar muestras de líquido duodenal o sueros de pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos con giardiosis y mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia evaluar su reconocimiento ya que podría constituir una molécula blanco de interés para la producción de una vacuna contra el parásito.

Con la finalidad de definir la participación directa de la CP90 en la adhesión del parásito se debe llevar a cabo la purificación de ésta y deben realizarse ensayos de adhesión a la línea celular IEC6, adicionando el suero anti-CP90 ó la CP90 purificada y evaluar si hay inhibición de la adhesión. Además, con la CP90 purificada se puede investigar su participación en daño a epitelio y se podría identificar y aislar su receptor en las células IEC6.

En términos generales, este estudio pone en evidencia la participación en su adhesión a las células epiteliales, así como la caracterización de una cisteína proteinasa que participa en la relación parásito-hospedero, aspectos que no se habían demostrado con anterioridad. Además, la importancia de los hallazgos obtenidos en esta tesis, abren la posibilidad de que en estudios futuros se realice la caracterización de moléculas secretadas por los trofozoitos y su posible participación en el daño epitelial observado en animales infectados, es decir en la patogénesis de la giardiosis.

VI. CONCLUSIONES

- Los trofozoitos de *G. lamblia* secretan proteinasas de tipo cisteína, de 198, 135, 120, 107, 73, 30 y 22 kDa. La actividad de las moléculas de 135, 107, 30 y 22 kDa aumenta cuando el parásito está en contacto con las células epiteliales IEC-6.
- En los sobrenadantes de los trofozoitos pre-tratados con TPCK y cultivados en interacción con IEC-6, la mayoría de las proteinasas fueron inhibidas, excepto la banda de 30 kDa.
- En sobrenadantes de trofozoitos pre-incubados con E64 y cultivados en interacción con IEC6, las proteinasas de 198, 135, 107 y 22 kDa aumentaron su actividad. También la proteínasa de 30 kDa, aunque en menor magnitud.
- La adhesión de los trofozoitos pre-tratados con E64 o TPCK a las células IEC6 se inhibió 36 y 45% respectivamente. Lo anterior sugiere la participación de las proteinasas secretadas por el parásito en el proceso de adhesión.
- La cisteína-proteínasa de 30 kDa secretada por los trofozoitos pre-tratados con TPCK, posiblemente esté relacionada con el daño celular observado en las células IEC6.

- El ensayo de ligandos fue una herramienta útil para identificar proteinasas de *G. lamblia* involucradas en la interacción con la célula epitelial.
- La CP90 es una proteinasa de tipo cisteína con afinidad a la superficie de las células IEC6, localizada en la superficie de los trofozoitos del parásito.
- Las condiciones óptimas para la actividad de la CP90 son similares a las encontradas en el intestino (37°C y pH de 5.5), hábitat de los trofozoitos de *G. lamblia*.
- La CP90 podría participar en la relación parásito-hospedero, reconociendo la superficie de las células epiteliales intestinales y en la evasión de la respuesta inmune del hospedero a través de su actividad de IgAsa.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adam R. D. The biology of *Giardia spp.* Microbiol Rev. 1991; 55:706-732

Adam, R. D., Aggarwal, A., Lal, A. A., De la Cruz, V. F., McCuthan, T., Nash, T. E. Antigenic variation of cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. J. Exp. Med. 1988; 167: 109.

Addis, M. F., Rappelli, P., Fiori, P. L. Host and tissue specificity of *Trichomonas vaginalis* is not mediated by its known adhesion proteins. Infect. Immun. 2000; 68: 4358-4360

Aggarwal, A. y Nash, T. E. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 36: 325-329

Aggarwal, A., Merritt, J. W., Nash, T. E. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 1989; 32: 39-42

Aggarwal, A. y Nash, T. E. Antigenic variation of *Giardia lamblia in vivo*. Infect. Immun. 1988; 56: 1420-1425

Alderete, J. F. y Garza, G. E. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of cell host surfaces. Infect. Immun. 1985; 50: 701-707

Alderete, J. F., Demés, P., Gombosóva, A., Valent, M., Fabusóva, M., Jánoska, A., Stefanóvic, J., Arroyo, R. Specific parasitism of purified vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 1988; 56(10): 2558-2562

Alderete, J. F. y Neale, K. A. Relatedness of structures of a major immunogen in *Trichomonas vaginalis* isolates. Infect. Immun. 1989; 57: 1849-1853

Alderete, J. F. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 1991; 174: 311-315

Alvarado, L. A. Actividad de proteasas en trofozoítos de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría en Ciencias, IPN 1994.

Alvarez-Sánchez, M. E., Ávila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-López, J., Arroyo, R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. Microb. Pathog. 2000, 28: 1-8

Argüello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L. y Ortega-Pierres, G. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. J. Antimicrob. Chemother. 2004 Oct; 54(4):711-721

Arroyo, R. y Alderete, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. Infect. Immun. 1989; 57: 2991

Arroyo, R., Engbring, J., Alderete, J. F. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol. 1992; 6: 853-857

Arroyo R. y Alderete J. F. The mechanism and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. Today. 1995;11:70-74

Barrett, A. J. In: Proteinase inhibitors. Barrett, A. J. and McDonald, G. (eds). Elsevier: Amsterdam.1986. pp: 3-

Belosevic, M. y Faubert, G. M. *Giardia muris*: correlation between oral dosage, course of infection, and trophozoite distribution in the mouse small intestine. Exp. Parasitol. 1983; 56: 352-359

Belosevic, M., Faubert, G. M., MacLean, J. D., Law, C., Croll, N. A. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. J. Infect. Dis. 1983; 147: 222-226

Belosevic, M., Faubert, G. M., Skamene, E., MacLean, J. D. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Giardia muris*. Infect. Immun. 1984. May; 44(2):282-286.

Belosevic, M., Faubert, G. M., MacLean, J. D. Suppression of primary antibody response to sheep erythrocytes in susceptible and resistant mice infected with *Giardia muris*. Infect. Immun. 1985. Jan; 47(1):21-25

Belosevic, M., Faubert, G. M., Dharampaul, S. Antimicrobial action of antibodies against *Giardia muris* trophozoites. Clin. Exp. Immunol. 1994. Mar; 95(3):485-489

Belosevic, M. y Daniels, C. W. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by cytokine-activated macrophages. Clin. Exp. Immunol. 1992. Feb; 87(2):304-309

Belosevic, M. y Faubert, G. M. Killing of *Giardia muris* trophozoites *in vitro* by spleen, mesenteric lymph node and peritoneal cells from susceptible and resistant mice. Immunol. 1986. Oct; 59(2):269-275

Belosevic, M. y Faubert, G. M. Lysis and immobilization of *Giardia muris* trophozoites *in vitro* by immune serum from susceptible and resistant mice. Parasite. Immunol. 1987. Jan; 9(1):11-19

Benchimol, M. A new set of vesicles in *Giardia lamblia*. Exp. Parasitol. 2002. Sep; 102(1):30-37

Bermúdez-Cruz, R. M., Ortega-Pierres, G., Ceja, V., Coral-Vázquez, R., Fonseca, R., Cervantes, L., Sánchez, A., Depardón, F., Newport, G., Montañez, C. A 63 kDa VSP9B10A-like protein expressed in a C-8 *Giardia duodenalis* mexican clone. Arch. Med. Res. 2004; 35: 199-208

Bernardis, F., F. A.de Muhlschlegel., A. Cassone., Fonzi, W. A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. Infect. Immun. 1998; 66: 3317-3325

Bertram, M. A., Meyer, E. A., Lile, J. D., Morse, S. A. A comparison of isoenzymes of five axenic *Giardia* isolates. J. Parasitol. 1983; 69: 793-797

Beynon R. J. y Bond, J. S. Proteolytic enzymes. A practical approach. IRL Press. 1994

Biagi, F. Epidemiología de la protozoosis. En: Biagi, F. Enfermedades parasitarias, México. D. F., Editorial La Prensa Mexicana. 1985: 65-68

Bienz, H.M., Da, W. T., Welle, M., Gottstein, B., Muller, M. Interleukin-6 deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. Infect. Immun. 2003; 71: 1569-1573

Bonaldo, M. C., D'Escoffier, L. N., Salles, J. M., Goldenberg, S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Exp. Parasitol. 1991; 73: 44-48

Bond, J. S., Butler, P. E. Intracellular proteases. Ann. Rev. Biochem. 1987; 56: 333-345

Bontempi, E., Martínez, J., Cazzulo, J. J. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biol. Parasitol. 1989; 33: 43-48

Boucher, S. E. M., Gillin, F. D. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cyst. Infect. Immun. 1990; 58: 3516-3522

Bózner, P. y Demes, P. Proteinases in *Trichomonas vaginalis* and *Tritichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type. *Parasitol.* 1991b; 102: 113-120

Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KGE. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology.* 2002; 25:11-19

Campbell, D., Chadee, K. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune responses. *Parasitol. Today.* 1997; 13(5): 184-190

Cedillo-Rivera, R., Enciso, M. J. A., Martínez, P. A., Ortega, P. M. G. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83: 644-650

Cedillo-Rivera, R. M., Ramírez, A., Muñoz, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 1992; 23(2): 59-63

Coombs, G. H. y North, M. J. An Analyses of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by acrylamide gel electrophoresis. *Parasitology.* 1983; 86:1-6

Craun, G. F. Waterborne outbreaks of giardiasis. Current status. In: Earlandsen, SS. L. and Meyer, E. A. (eds). *Giardia* and *Giardiasis*, Plenum Press, New York, 1986, pp 243-250

Crossley, R. y Holberton, D. V. Characterization of the proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* 1983; 59: 81-88

Chávez, B., González-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R., Martínez-Palomo, A. *Giardia lamblia*: *in vitro* cytopathic effect of human symptomatic and asymptomatic isolates. *Exp. Parasitol.* 1995; 80: 133-137

Chávez, B., Knaipe, F., González-Mariscal, L., Martínez-Palomo. *Giardia lamblia*: Electrophysiology and ultrastructure of citopathology in cultured epithelial cells. *Exp. Parasitol.* 1986; 61:379-384

Chin A. C., Teoh D. A., Scott, K. G. E., Meddings, J. B., Macnaughton, W. K., Buret, A. G. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* 2002; 70:3673-3680

Dalton, C., Goater, A. D., Burt, J. D., Smith, H. V. Analysis of parasites by electrorotation. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 96(1):24-32. Review

Das, S. y Gillin, D. F. *Giardia lamblia*: increased UDP-N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine transferase activities during encystation. *Exp. Parasitol.* 1996; 83: 19-24

Dullery, J. R., Grieve, P. A. A simple technique for eliminating interference by detergent in the Lowry method of protein determination. *Ann. Biochem.* 1975; 64: 163

Eakin, A. E., Bouvier, J., Sakanari, J. A., Craik, C. S., McKerrow, J. H. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 39: 1-8

Edlind, T. D., Hang, T. L., Chakraborty, P. R. Activity of antihelminthic benzimidazoles against *Giardia lamblia* *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 1408-1413

Einfield, A. David., Stibbs, H. Henry. Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1984; 46(2): 377-383

Embley, T. M. y Hirt, R. P. Early branching eukaryotes?. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8(6):624-629. Review

Enciso, M. J. A., Fonseca, R., Arguello, R., Cedillo, R., Ortega-Pierres, G. Recurrent variations of surface antigens in clones of *Giardia lamblia*. The 38 Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1988: 163-168

Enciso, M. J. A. Obtención y caracterización de aislados de *Giardia lamblia* de individuos sintomáticos y asintomáticos. Tesis de Doctorado. 1990

Erlandsen, L. S., Macechko, T. P., Van-Keulen, H., Jarroll, L. E. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Euk. Microbiol.* 1996; 43(5): 416-420

Erlich, J. H., Anders, R. F., Roberts-Thomson, I. C., Schrader, J. W., Mitchell, G. F. An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity reactions as contributing factors to chronic infection with the intestinal protozoan parasite, *Giardia muris*, in mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1983; 61(Pt 5):599-615

Espinosa-Cantellano, M y Martínez-Palomo, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: From molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rew.* 2000; 13:(2):318-331

Farthing, J. G., Pereira, E. A. M., Keusch, G. T. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1986; 51(2):661-666

Farthing, M. J. G. Host-parasite interactions in humans giardiasis. *Quar. J. Med.* 1989; 70: 191-198

Farthing, M. J. G. New perspectives in giardiasis. *J. Med. Microbiol.* 1992; 37:1-10

Faubert, G. M. Evidence that giardiasis is a zoonosis. *Parasitol. Today.* 1988; 4: 66-68

Feely, D. A., Schollmeyer, J. V., Erlandsen, S. L. *Giardia*: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* 1982; 53: 145-150

Feely, D. E. Acid hydrolase cytochemistry of *Giardia*. *Microecol. Ther.* 1985; 15: 149

Feely, D. E., Dyer, J. K. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J. Protozool.* 1987; 34:80-83

Fenchel, T. y Finlay, B. J. Divergent perspectives on protists species richness. *Protist.* 1995; 150: 229-233

Ferguson, A., Gillon, J. y Munro, G. Pathology and pathogenesis of the intestinal mucosal damage in giardiasis. In giardiasis. Meyer E. A. (eds.) Elsevier: Amsterdam. 1990; pp 155

Garber, G. y Lemchuk-Favel, L. T. Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Can. J. Biochem.* 1989; 35: 903-907

García-Rivera, G, Rodríguez, M. A., Ocadiz, M., Martínez-López, M., Arroyo, R., González-Robles, A., Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin from the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* 1999; 33:556-568

Gerwin, G. J., van Kuik, J. A., Leeftang, B. R., Kamerling, J. P., Viegenthart, J. F. G., Karr, C. D., Jarroll, E. L. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel β (1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiol.* 2002; 12: 499-505

Gillin, F. D., Reiner, D. S., Boucher, S. E. Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Infect. Immun.* 1988; 56: 705-709

Gillin, F. D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S. B., Reiner, D. S., McCaffery, M. S. D., Guiney, D. G. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87: 4463-4469

Gillon, J., Ferguson, A. Changes in the small intestinal mucosa in giardiasis. En: Erlandsen S. L., Meyer, E. A. *Giardia and giardiasis*. New York, Plenum, Press. 1984; 163-170

Goka, A. K. J., Rolston, D. D. K., Mathan, V. I., Farthing, M. J. G. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunoabsorbent assay. Lancet. 1986; 2: 184

González-Castro, J., Mascaro, M. L., Mascaro, M. C. Study of an amoeboflagellate isolated from the nasal mucosa of man. J. Protozool. 1986; 33(1):89-93

Gosttein, B., Harriman, G. R., Conrad, T. J., Nash, T. E. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral response in a mouse model. Parasitol. Immunol. 1990; 12: 659-666

Greig, S. y Ashall, F. Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. Mol. Biochem. Parasitol. 1990; 39: 31-38

Guimaraes, S., Terra, L. S. M. I., Fabiano, F. M. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003; 98(1): 77-81

Halliday, C. E. W., Clark, C., Farthing, M. G. *Giardia* bile-salt interactions *in vitro* and *in vivo*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1988; 82: 428-433

Hare, D. F., Jarroll, E. L., Lindmark, D. G. *Giardia lamblia*: characterization of proteinase activity in trophozoites. Exp. Parasitol. 1989; 68: 141-144

Harth, G., Andrews, N., Mills, A., Engel, J., Smith, R., McKerrow, J. H. Peptide fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 1992; 47: 821-825

Hernández-Gutiérrez, R., Ávila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutiérrez, G., Arroyo, R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39 kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. Exp. Parasitol. 2004; 107: 425-435

Hernández, H., Sariago, I., Garber, G., Delgado, R., López, O., Sarracent, J. Monoclonal antibodies of *Trichomonas vaginalis* decrease parasite cytoadherence to epithelial cells and confer protection in mice. *Parasite Immunol.* 2004; 26(3):119-125

Hernández, J. Identificación de una molécula de superficie de *Giardia lamblia* de \approx 200 kDa y su participación en el fenómeno de adherencia. Tesis de Doctorado. IPN, 1992

Hewlett, E. L., Andrews, J. S., Ruffier, J., Schaefer, F. W. Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. *J. Infect. Dis.* 1982; 145(1):89-93

Heyworth, M. F., Owen, R. L., Jones, A. L. Comparison of leukocytes obtained from the intestinal lumen of *Giardia*-infected immunocompetent mice and nude mice. *Gastroenterology.* 1985; 89(6):1360-1365

Hill, R. D., Hewlett, E. L., Pearson, R. D. Lectin binding by *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1981; 34(3): 733-739

Inge, P. M. G., Edson, C. M., Farthing, M. J. G. Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut.* 1986; 29: 795-799

Itow, S y Camargo, E. D. Proteolytic activities in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 1977; 29: 591-595

Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., Coggins, J. R., Erlandsen, S. L. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 32(2-3):121-131

Jiménez, J. C., Uzcanga, G., Zambrano, A., Di Prisco, M., Lynch, N. R. Identification and partial characterization of excretory/secretory products with proteolytic activity in *Giardia intestinalis*. *J. Parasitol.* 2000;86:662-667

Jiménez, J. C., Fontaine, J., Grzych, J. M., Dei-Cas, E., Capron, M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2004; 11:152-160

Katellaris, P. h., Naeem, A., Farthing, M. J. G. An *in vivo* model of attachment of *Giardia lamblia* to an intestinal cell line. *Gut.* 1995; 33 (suppl 2):S187-192

Kaur, H., Ghosh, S., Samra, H., Vinayak, V. K., Ganguly, N. K. Identification and characterization of an excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*. 2001;123:347-356

Keene, E. W., Hidalgo, M. E., Orozco, E. *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of the cysteine protease. *Exp. Parasitol.* 1990; 71: 199-204

Keene, W. E., Peattie, M. G., Allen, S., McKerrow, J. H. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 536-540

Keister, D. B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S33 medium supplemented with bile. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* 1986; 77: 487-493

Knaippe, F. *Giardia lamblia* attachment to biological and inert substrates. *Micr. Electr. Biol. Cel.* 1990; 14 (1) 35-39

Knight, R. Epidemiology and transmission of giardiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980; 74:433-436

Korman, S. H., Bar-Oz., B., Mandelberg, A., Matoth, I. Giardiasis with protein-losing enteropathy: Diagnosis by fecal α 1-antitrypsin determination. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 190; 10: 249-254

Kunimoto, D., Nordan, R., Strober, W. IL-6 is a potent cofactor of IL-1 in IgM synthesis and of IL-5 in IgA synthesis. *J. Immunol.* 1989; 143: 2230-2235

Lane, S. y Lloyd, D. Current Trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002; 28: 123-147

Langford, C. K., Ewbank, S. A., Hanson, S. S., Ullman, B., Landfear, J. M. Molecular characterization of two genes encoding members of the glucose transporter superfamily in the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 55(1-2):51-64

Lehker, M. W., Chang, T. H., Dailey, D. C., Alderete, J. F. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med.* 1991, 171: 2165-2170

Leippe, M., Sievertsen, H. J., Tannich, E., Horstmann, R. D. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, 1995; 111: 569-574

Lev, B., Ward, H., Keusch, T. G., Pereira, E. A. M. Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: A novel host-parasite interaction. *Science* 1986; 232:71-76

Lindmark, D. G. *Giardia lamblia*: localization of hidrolase activities in lisosome-like organelles of trophozoites. *Exp. Parasitol.* 1988; 65: 141-145

Lockwood, B. C., North, M. J., Coombs, G. H. *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus* and *trichomitus batrachorum*: comparative proteolytic activity. *Exp. Parasitol.* 1985; 58: 245-253

Lockwood, B. C., North, M. J., Coombs, G. H. The use of highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987; 24: 89-93

Lockwood, B. C., North, M. J., Coombs, J. H. Proteolysis in trichomonads. *A. Univ. Car. Biol.* 1986; 30: 313-316

Lowry, O. H., Rosembroug, N. J., Far, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biochem.* 1951; 93:265-275.

Luaces, A. L. y Barret, A. J. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Biochem.* 1988; 250: 903-907

Luján, D. H., Mowatt, R. M., Conrad, T. J., Bowers, B., Nash, E. T. identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. *J. Biol. Chem.* 1995a; 270:29307-29312

Luján, D. H., Mowatt, R. M., Wu, J.J., Lu, Yu., Lees, A., Chance, R. M., Nash, T. E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 1995b; 270: 13807

Lushbaugh, WB., Hofbauer, A. F., Pittman, F. E. *Entamoeba histolytica*: Purification of cathepsin B. *Exp. Parasitol.* 1985; 59: 328-333

Lloyd, D. y Wallis, P. A *Giardia* feast. *Trends. Parasitol.* 2001; 17(3):115-117

Lloyd, D. y Harris, J. C. Hydrogen production in *Giardia intestinalis*, a eukaryote with no hydrogenosomes. *Trends Parasitol.* 2002; 18(4):155-156

Macechko, P. T., Steimle, P. A., Lindmark, D. G., Erlandsen, S. L., Jarroll, E. L. Galactosamine synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 56: 301-310

Magne, D., Favennec, L., Chochillo, C., Gorenflot, A., Meillet, D., Kapel, N., Raichvarg, D., Savel, J., Gobert, J. G. Role of cytoskeleton and surface lectins in *Giardia duodenalis* attachment to CaCo-2 cells. *Parasitol. Res.* 1991; 77:659-666

Mantovani, M. P., Gaundalini, S., Ecuba, P., Corvino, C., di Martino, L., Lactose malabsorption in children with symptomatic *Giardia lamblia* infections: Feasibility of yoghurt supplementation. *J. Pediatr. Gastroenter. Nutr.* 1989; 9: 295-300.

Martínez-Palomo A, González-Robles A, Chávez B, Orozco E, Fernández S, Cervantes A. Structural basis of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 1985; 32:166-175

Mason, R. W. Proteinases of mammals: an overview. In: *Biochemical Protozoology*. Coombs, G. and North, M. (eds). Taylor and Francis: London. 1991. pp:168-172

McCabe, R. E., Yu, G. S. M., Contreas, C., Morrill, P. R., McMorrow, B. *In vitro* model of attachment of *Giardia intestinalis* trophozoites to IEC6 cells, an intestinal cell line. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1991; 35:29-35

McKerrow, J. H. and Doenhoff, M. J. Schistosome proteasas. *Parasitol. Today* 1988; 4: 334-336

McKerrow, J. H., Rosenthal, P., Sun, E., Bouvier, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 1993; 47: 821-827

McLaughlin, J., Faubert, G. Partial purification and some properties of neutral sulfhydryl and an acid proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Can. J. Microbiol.* 1977; 23: 420-425

Meirelles, M. N. L., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S. G., Costa, E. M., Murta, A. C. M., Scharfstein, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 52: 175-179

Meloni, B. P., Limbery, A. J., Thompson, C. A. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38: 65-70

Mendoza-López, M., Becerril-García, R. C., Fattel-Facenda, L. V., Ávila-González, L., Ruiz-Tachiquín, M. E., Ortega-López, J., Arroyo, R. CP30: A cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect. Immun.* 2000; 68: 4907-4912

Meyer, E. A. Taxonomy and Nomenclature: In giardiasis. 1990 Meyer, E. A (ed.) Elsevier: Amsterdam. pp 51-62

Meyer, E. A. *Giardia* as an organism: In *Giardia* from molecules to disease. 1994. Thompson, R: C: A., Reynolson, J. A., Lymbery, A. J. (ed). CAB International. pp 6

Mowatt, M. R., Aggarwal, A., Nash, T. E. Carboxyl terminal sequence conservation among variant specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 49: 215-219

Muller, N., Gottstein, B. Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28: 1829-1939

Muñoz, M. L., Calderón, J., Rojkin, M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 1982; 155: 42-50

Narcisi, E. M., Paulin, J. J., Fechheimer, M. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J. Parasitol.* 1994; 80 (3): 468-473

Nash, T. E., Aggarwal, A., Adam, R. D., Conrad, J. T., Merrit, J. W. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immun.* 1988; 141: 636-639

Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., Levine, M. M. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 1987; 156: 974-984

Nash, T. E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J. D., Conrad, J. D., Gillin, F. D. Restriction endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J. Infect. Dis.* 1985; 152: 64-68

Nash, T. E., Conrad, J. T., Merrit, J. W. Jr. Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 42: 125-130

Nash, T. E., Merritt, J. W. Jr., Conrad, J. T. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect. Immun.* 1991; 59: 1334-1339

Nash, T. E., Mowatt, R. M. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group specific gene. *Exp. Parasitol.* 1992; 75: 369-374

Neale. K. A. y Alderete, J. F. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect. Immun.* 1990; 58: 157-162

North, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotes microorganism. *Microbiol Rev.* 1982.; 46: 308-313

North, M. J., Colin, D. R., Coombs, G. H. The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrates and specific inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990a; 39: 183-187

North, M. J., Motram, J. C., Coombs, J. H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* 1990b; 6: 270-275

Nowak N, Lotter H, Tannich E, Bruchhaus I. Resistance of *Entamoeba histolytica* to the cysteine proteinase inhibitor E64 is associated with secretion of pro-enzymes and reduced pathogenicity. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:38260-38266

Ortega-Pierres., M. G., Enciso, M. J. A., Fonseca-Liñán, S. R., Arguello, G. R. Caracterización de antígenos de superficie variables de *Giardia lamblia*. Cambios recurrentes y su relación con la adhesión del parásito a células epiteliales *in Vitro*. XI Reunión de Investigación. Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, 1991

Paget TA, James SL. The mucolytic activity of polyamines and mucosal invasion. *Biochem. Soc. Trans.* 1994; 22: 3945-3985

Papanastasiou, P., Hiltpod, A., Bommeli, C., Köhler, P. The release of the variant surface protein of *Giardia* to its soluble isoform is mediated by the selective cleavage of the conserved carboxy-terminal domain. *Biochem.* 1996; 35: 10143-10148

Parenti, D. M. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 1989; 160: 1076-1080

Peattie, D. A. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitol. Today.* 1990; 6: 52-56

Peattie, D. A., Alonso, R. A., Caufield, J. P. Ultrastructural localizations of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J. Cell Biol.* 1989; 109: 2323-2327

Pegado, M. G, F. and Souza, W. Role of surface components in the process of interaction of *Giardia duodenalis* with epithelial cells *in vitro*. *Parasitol. Res.* 1994;80:320-325

Pérez-Monfort, R., Ostoa-Saloma,P., Velázquez-Medina, L., Monfort, I., Becker, I. Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987; 26: 87-95

Pereira, M. E. A. *Cell Biology of Trypanosoma cruzi*. In: *Modern Parasite Biology*. Ed. Wyler, D. J. Freeman. New York, pp 64. 1990

Petersen, L. R., Cartter, M. L., Hadler, J. L. A food borne outbreak of *Giardia lamblia* . *J. Infect. Dis.* 1988; 157: 846-850

Pimenta, P. F. P., Da Silva, P. P., Nash, T. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a tick cell coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infect. Immun.* 1991; 59: 3989-3996

Piras, M. M., Henríquez, D., Piras, R. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*- fibroblast. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985; 14: 151-156

Provenzano, D. y Alderete, J. F. Análisis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis* . *Infect. Immun.* 1995; 63:3388-3395

Que, X., Reed, S. L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol. Today.* 1997; 13(5): 161-166

Radulescu, S., Meyer, E. A. *In vitro* cultivation of *Giardia* trophozoites. In giardiasis. E. A. Meyer (eds). Elsevier, Amsterdam. 1990, pp 99

Radulescu, S., Rau, C., Petrasincu, D., Gaicu, N., Meyer, E. A. Behavior and cytopathogenicity of *Giardia lamblia* in cell cultures. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.* T. 1980; 39: 163-167

Ramírez, M., Meutel, L., Rivera, M., Corcho, A., Gamboa, D. Amoebea and Giardia risks factors of anemia in infants from a rural community in Mexico. Abstracts 3rd World of Pediatric Infectious Diseases. Chile, 2002: 95-97

Reed, S. L., Keene, W. E., McKerrow, J. H. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Immun. 1989; 27: 2772-2778

Reed, S. L., Keene, W. E., McKerrow, J. H., Gigli, I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. J. Immun. 1989; 143: 189-194

Reiner, D. S., McCaffery, M., Gillin, F. D. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Eur. J. Cell. Biol. 1990; 53(1):142-153

Rivera, M., De la Parte, M., Hurtado, P., Magaldi, L., Collazo, M. Giardiasis intestinal, mini revisión. Invest. Clin. 2002; 43: 1-12

Rodríguez, M. A., Orozco, E., Arroyo, R. Proteins of *Entamoeba histolytica* trophozoites involved in the adhesion to target cells. Arch. Med. Res, 1994; 25:205-210

Rodríguez-Fuentes, G. B. Análisis de la actividad proteolítica de trofozoítos de cepas y clonas de *Giardia lamblia* y su relación con adhesión. Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM, 1998.

Rosenthal, P. J., Kim, K., McKerrow, J. H., Leech, J. H. Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. J. Exp. Med. 1987; 166: 816-820

Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Rasnick, D., Leech, J. H. *Plasmodium falciparum*: Inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. Mol. Biochem. Parasitol. 1989; 35: 177-185

Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Alkawa, M., Nagasawa, H., Leech, J. H. A malarial cysteine proteinase is necessary for haemoglobin degradation for *Plasmodium falciparum*. J. Clin. Invest. 1988; 82: 1560-1565

Roskens, H. y Erlandsen, S. L. Inhibition of in vitro attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. J. Parasitol. 2002; 88(5):869-873

Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S., McKerrow, J. H. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1989; 86: 4863-4870

Samra, H. K., Ganguly, N. K., Garg, U. C., Goyal, J., Mahajan, T. Effect of excretory-secretory products of *Giardia lamblia* in glucose and phenylalanine transport in the small intestine of Swiss albino mice. *Biochem. Int.* 1988;17:801-812

Schmerin, M. J., Jones, T. C., Klein, H. Giardiasis: association with homosexuality. *Ann. Intern. Med.* 1978; 88: 801-803

Shant, J., Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Ganguly, N. K., Majumdar, S. A potentially important excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* 2002; 102:178-186

Shant, J., Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Ganguly, N. K., Majumdar, S. A. Mode of action of a potentially important excretory-secretory product from *Giardia lamblia* in mice enterocytes. *Parasitology*. 2004a; 131: 57-69

Shant, J., Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Ganguly, N. K., Majumdar, S. A. The alteration in signal transduction induced by the excretory-secretory product from *Giardia lamblia*. *Parasitology*. 2004b; 129:421-430

Silva-Filho, F. C., de Souza, W., Lopes, J. D. Presence of laminin-binding proteins

Silva-Filho, F. C., de Souza, W., The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells in vitro. *Cell Struct Funct.* 1988;13:301-310

Silva-Filho, F. C., de Souza, W. Effect of metronidazole on the cell surface charge of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Braz J Med Biol Res.* 1988;21:1037-1045

Silva-Filho, F. C., Ortega-López, J., Arroyo, R. YIGSR is the preferential laminin-1 residing adhesion sequence for *Trichomonas vaginalis*. *Exp. Parasitol.* 1998; 88: 240-242

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 1997; 14(37): 8

Souto-Padrón, T., Reyes, M. B., Leguizamón, S., Campetella, O. E., Frasc, A. C. C., De Souza, W. *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. *Eur. J. Cell. Biol.* 1989; 50: 272-280

Sousa, M. C., Goncalves, C. A., Bairos, V. A., Poiaraes, J., Da-Silva, J. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8(2): 258-265

Stager, S. B., Gottstein, B., Muller, N. Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Int. J. Parasitol.* 1997; 27: 965-971

Stager, S. B., Muller, N. *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect. Immun.* 1997; 65: 3944-3946

Touz, M. C., Nores, M. J., Slavin, I., Piacenza, L., Acosta, D., Carmona, C., Luján, H. D. Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation-specific gene expression during *Giardia* differentiation. *Biochem. J.* 2002; 364: 703-710

Udezulu, Y. A., Visvesvara, G. S., Moss, D. M., Leitch, G. J. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. *Infect. Immun.* 1992; 60: 227-233

Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, C. J., Franklin, C., McKerrow, J. H. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell.* 1997; 89: 437-444

Ward, D. H., Keusch, G. T., Pereira, M. E. A. Induction of a phosphomannosyl binding lectin activity in *Giardia*. *Bioessays.* 1990; 12: 211-215

Ward, D. H., Lev, Y. V., Kane, V. A., Keusch, T. G., Pereira, E. A. M. Identification and characterization of taglin, a mannose 6-phosphate binding, trypsin activated lectin from *Giardia lamblia*. *Biochem.* 1987; 26: 8669-8674

Werries, E., Franz, A., Hippe, H., Acil, Y. Purification and substrate specificity of two cysteine proteinases of *Giardia lamblia*. *J. Protozool.* 1991; 38: 378-384

Wilcox, D. y Mason, R. W. Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells. *Biochem. J.* 1992; 285: 495-502

Wlaker, S. T. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, 1a. ed. 1998. 460-471

World Health Organization, Guidelines for the Prevention and Control of Giardiasis, Parasitic Diseases program, Diarrhoeal Diseases Control Programme, 1986

Williams, G. A., Coombs, H. G. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. Inter. J. Parasitol. 1995; 25: 771-777

Zhou, P., Zhu, N., Robertson, J., Nash, T., Singer, M. S. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. Infect. Immun. 2003; 71: 1566-1568

APÉNDICE A

MATERIALES Y REACTIVOS.

➤ MATERIALES

Botellas para cultivo celular de 7.5 cm². Corning-Costar, U.S.A.

Cámara de transferencia, Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Cámara de electroforesis vertical mini-protean II. Bio-Rad, Laboratories. Richmond, CA U.S.A.

Centrífuga Mikro 22R. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania.

Centrífuga Sorvall RC 5B. Du Pont Instruments, U.S.A.

Centrífuga Sorvall RT6000D. Du Pont, U.S.A.

Contador de centelleo. Beckman Minaxi β tri-carb 4000 series

Espectrofotómetro Ultrospec 2000. Pharmacia Biotechnology, Suecia.

Espectrofotómetro. Beckman DU-65, U.S.A.

Generador de ultrasonido MSE

Incubadora con suministro de CO₂. Nuair US Autoflow Modelo UN-4750. Plymouth, MN, U. S. A.

Microcentrífuga Eppendorf 5415C. Brinkmann Instruments Inc., Alemania.

Microplacas de cultivo de 12 y 24 pozos. Corning-Costar, U.S.A.

Microscopio óptico. BHA, Olympus, Japón.

Microscopio de epifluorescencia Marca Zeiss®

Microscopio electrónico de barrido JEOL 35-C

Peines de 10 pozos y 0.75 mm de grosor Bio-Rad, Laboratories. Richmond, CA U.S.A.

Pipetas pasteur. Marca . Corning-Costar, U.S.A

Pipetas graduadas de 5 y 10 mL. Pyrex, U. S. A.

Sistema de ultrafiltración Centriprep. Millipore-Amicon, U. S. A.

Tubos de ensaye de 13x100 y 25x170 mm con tapón de rosca. Pyrex, U.S.A.

Tubos eppendorf siliconizados de 1.5 mL. Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Tubos Falcon cónicos de 15 y 50 mL. Corning-Costar, U.S.A.

Vórtex. Scientific Industries, U.S.A

➤ REACTIVOS

Acetato de sodio. Mallincrodt, U.S.A.

Ácido acético. J.T. Baker, México.

Ácido clorhídrico. EM SCIENCES, Canadá.

Acrilamida. Promega, U.S.A

Agarosa. Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.

Albúmina sérica bovina (ASB). Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A.

Amortiguador Tris-base pH 8.3. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A.

Antibióticos (Mezcla de Penicilina-Estreptomicina 5 000 U/ μ g/ μ L). In vitro, México.

Azul de bromofenol. Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.

Azul de Coomassie R-250. Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Azul tripano (0.4% en NaCl al 0.85%). In vitro, México.

Bisacrilamida. Sigma Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A.

β -mercaptoetanol. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A

Carbonato de sodio. J.T.Baker, U.S.A.

Desoxicolato de sodio (DOC). Sigma, Chemical, St. Louis Mo. U. S. A.

Dietilpirocarbonato. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U. S. A.

Dimetil-sulfóxido (DMSO). Merck, México.

Dodecil sulfato de sodio (SDS). Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Etanol. Amresco, U.S.A.

Gelatina de piel de cerdo al 0.2% Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U. S. A.

Formaldehído. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U. S. A.

Glicerol. Gibco BRL, U.S.A.

Glicina. Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Glutaraldehído. Merck, Alemania.

Hemoglobina humana. Obtenida para su uso en el laboratorio.

Hidróxido de sodio. Merck, México.

IgG, IgA, IgAs, ICN Biomedicals, Inc. Ohio, U.S.A.

Inhibidores de proteinasas: E64 (trans-Epoxisuccinil-L-Leucilamido-[4-guanidino]-Butano), TPCK (L-1-cloro-3-[4-tosilamido]- 4-fenil-2-butanona, tosil fenilalanil clorometilcetona) y para las de tipo metalo: 1, 10 fenantrolina y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U. S. A

Isopropanol. J.T.Baker, México.

Marcadores de bajo peso molecular para SDS-PAGE. Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Marcadores de amplio rango de peso molecular para SDS-PAGE. Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Medio de cultivo DMEM-Hybrimax. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U. S. A

Metanol. J. T. Baker, México.

Mucina bacteriológica, Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A

Papel de nitrocelulosa (PNC), Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.

Pansorbin. Calbiochem, Co. CA, U. S. A

Persulfato de amonio Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

N, N, N', N', tetrametilendiamina (TEMED) Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Pironina Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A

PPO 2, 5- Difeniloxazol. Mallinckrodt, U. S. A

POPOP p- bis[2- (5- feniloxazolil)]- benceno. Mallinckrodt, U. S. A

Reactivo de Folin-Ciocalteu. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A .

Solución de anfolinas con un intervalo de pH de 3-10 al 1% Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Solución de anfolinas con un intervalo de pH de 5-7 al 4% Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A

Solución de Tripsina-Verseno (0.05%:0.05% en NaCl al 0.85%). In vitro, México.

Suero fetal definido de bovino. Hyclone, Logan, UT, U.S.A.

Suero de ternera definido Hyclone, Logan, UT, U.S.A

Sulfato de cobre heptahidratado. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A

Sulfato de Polimixina B. SIGMA-ALDRICH, Alemania.

Tartrato de sodio y potasio. Mallinckrodt, U.S.A.

Timidina tritiada. Amersham, Biosciences, Little Chalfont, U. K.

Tris-HCl. Sigma, Chemical, Co. St. Louis Mo. U.S.A

Tritón X-100 Bio-Rad, Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.

Zwitterionic 3-12. Calbiochem, Co. CA, U. S. A

APÉNDICE B

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 PARA *Giardia lamblia*. (Keister modificado, 1973)

Biosate	30.0 g
Glucosa	10.0 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Cisteína monoclóhidrato	2.0 g
Ácido ascórbico	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico	0.6 g
Fosfato de sodio dibásico	1.0 g
Citrato férrico de amonio	23mg

Disolver en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 6.8-6.9 y aforar a 900 mL. Filtrar en membrana de 0.22 μ M de diámetro de poro.

Realizar prueba de esterilidad. Completar con 100 mL de suero bovino descomplementado y 1 mL de stock de penicilina-estreptomina (50,000UI-50 mg). Almacenar a 4°C hasta su uso.

APÉNDICE C

SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA OBTENCIÓN DEL LISADO TOTAL DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia lamblia*

AMORTIGUADOR SALINO DE FOSFATOS (ASF) pH 7.3

(Stock 10X)

Cloruro de sodio (NaCl)	80.00 g
Cloruro de potasio (KCl)	2.00 g
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	2.00 g
Fosfato monobásico de sodio dodecahidratado (NaH ₂ PO ₄ -12 H ₂ O)	28.98 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	11.50 g
Fosfato monobásico de sodio heptahidratado (NaH ₂ PO ₄ -7H ₂ O)	21.69 g

Se disuelven perfectamente los componentes en el orden que se mencionan en 800 mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.3, se afora a 1000 mL y se esteriliza en autoclave.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA 5X

Trisma-base 2M pH 6.8	1.56 mL
SDS al 20%	5.00 mL
Glicerol	1.94 mL
Pironina al 2% en glicerol al 60%	50 µL

Llevar a 10 mL con agua bidestilada.

APÉNDICE E

PREPARACIÓN DE GELES PAGE-SDS COPOLIMERIZADOS CON GELATINA

- Gel espaciador al 10%

BGE 5X	3.76 mL
Agua bidestilada estéril o gelatina al 0.2%	8.88 mL
Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%	6.32 mL
TEMED	12 µL
Persulfato de amonio al 10%	44 µL

Mezclar perfectamente y vaciar en la cámara de electroforesis previamente montada, esperar hasta que polimerice.

- Gel concentrador al 5%

BGC 8X	2.5 mL
Agua bidestilada estéril	14.16 mL
Acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%	3.32 mL
TEMED	12 µL
Persulfato de amonio al 10%	110 µL

Mezclar todos los componentes agregando uno por uno en el orden arriba mencionado y vaciar en la cámara de electroforesis colocando el peine, la polimerización se llevará a cabo en aproximadamente 15 minutos.

APÉNDICE F

SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN UNA DIMENSIÓN

AMORTIGUADOR DE CORRIDA

(Stock 10X)

Trisma-Base	30.2 g
Glicina	144.1 g
*SDS	5.0 mL/20%

*Se esteriliza previamente por filtración con membrana de 0.45 µm.

Los componentes se disuelven por agitación en 800 mL de agua bidestilada estéril, se ajusta el pH a 8.3 y finalmente se afora a 1000 mL.

AMORTIGUADOR PARA EL GEL CONCENTRADOR (BGC 8X)

Trisma-base 2 M pH 6.8	50.0 mL
SDS al 20%	4.0 mL

Aforar a 100 mL con agua bidestilada.

AMORTIGUADOR PARA EL GEL ESPACIADOR (BGE 5X)

Trisma-base 2 M pH 8.8	187.5 mL
SDS al 20%	5.0 mL

Aforar a 200 ml con agua bidestilada.

ACRILAMIDA 30%/BISACRILAMIDA 0.8%

Acrilamida	60.0 g
N' N' metilen bis acrilamida	1.6 g
Glicerol	60.0 mL

Aforar a 200 mL con agua bidestilada y posteriormente filtrar varias veces.

PREPARACIÓN DE SUSTRATOS

- Gelatina de piel de cerdo al 0.2%

Disolver 0.2 g de gelatina de piel de cerdo en 90 mL de agua bidestilada estéril calentando ligeramente sin hervir; una vez disuelta aforar a 100 mL y filtrar con membrana de 0.45 μ m. Mantener en refrigeración hasta su uso. La mucina se prepara de la misma forma.

- Inmunoglobulinas : IgA, IgAs, IgG

En los tres casos se emplea 1.5 mg de cada inmunoglobulina por gel, disuelta previamente en agua bidestilada estéril.

AMORTIGUADOR DE ACETATOS pH 5.5

Acetato de sodio 0.1 M (10X)

Disolver 6.1236 g de acetato de sodio en 900 mL de agua bidestilada estéril. Ajustar pH a 5.5 y aforar a 1000 mL.

SOLUCIÓN PARA TEÑIR

Metanol 500 mL

Ácido acético 100 mL

Azul de coomassie R-250 1 g

Disolver perfectamente el colorante y aforar a 1000 mL con agua bidestilada estéril.

SOLUCIÓN PARA DESTENIR

Se emplea ácido acético glacial al 10% (v/v) en agua bidestilada estéril.

APÉNDICE G

SOLUCIONES EMPLEADAS PARA LA REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN DOS DIMENSIONES

GEL DE LA PRIMERA DIMENSIÓN

Urea 9.2M	5.5 g
Tritón X-100 al 10%	2.0 mL
Acrilamida al 4%	1.33 mL
Anfolinas Bio-lyte 5/7	400 µL
Anfolinas Bio-lyte 3/10	100 µL
Agua bidestilada estéril	1.97 mL

Disolver agitando y calentando ligeramente. Agregar 10 µL de persulfato de amonio al 10% y 10 µL de TEMED.

SOLUCIÓN REGULADORA

Tris-HCl 0.5M pH 6.8	12.5 mL
SDS al 10%	23.0 mL
B-mercaptoetanol	5.0 mL
Glicerol al 10%	8.0 mL
Azul de bromofenol 0.05%	2.5 mL
Agua destilada	49.0 mL

La mitad de esta solución se prepara con el β -mercaptoetanol y la otra mitad se deja sola. Esta última se utilizará posteriormente para preparar un sellador para el gel con agarosa.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA LA PRIMERA DIMENSIÓN

Urea	5.7 g
Tritón X-100 al 10%	2.0 mL
Agua bidestilada estéril	2.0 mL
Agitar y disolver para posteriormente agregar:	
Anfolinas Bio-lyte 5/7	400 μ L
Anfolinas Bio-lyte 3/10	100 μ L
Homogenizar perfectamente.	

SOLUCIÓN OVERLAY

Urea	5.41 g
Agua bidestilada estéril	1.0 mL
Agitar y disolver. Posteriormente agregar:	
Anfolinas Biol-lyte 5/7	200 μ L
Anfolinas Bio-lyte 3/10	50 μ L
Azul de bromofenol	500 μ L

Disolver, hacer alícuotas y congelar hasta su uso.

AMORTIGUADOR DE LISIS

Urea 9.5M, tritón X-100 al 10% (v/v), anfolinas Bio-lyte 3/10 y β mercaptoetanol al 5% (v/v)

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LA CAMA SUPERIOR

NaOH 100 mM

Disolver 0.2 g de hidróxido de sodio en 250 mL de agua bidestilada estéril, guardar a 4°C hasta su uso. Previamente degasificar la solución durante 30 minutos.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LA CAMA INFERIOR

H₃PO₄ 10 mM

Homogenizar 1.36 mL de ácido fosfórico concentrado en 2000 mL de agua bidestilada estéril, guardar a 4°C hasta su uso. Degasificar previamente la solución durante 30 minutos.

APÉNDICE H

SOLUCIONES EMPLEADAS PARA EL CULTIVO Y FIJACIÓN DE CÉLULAS IEC6

- L-glutamina

Disolver 2.92 g de glutamina en agua bidestilada estéril y filtrar con membrana de 0.22 μm . Hacer alícuotas de 2 mL y congelar hasta su uso.

- Tripsina

Trisma-base 0.606 g

EDTA 0.030 g

Agregar 50 mL de agua bidestilada estéril, mezclar y ajustar pH 7.5.

Agregar:

Fosfato de potasio monobásico anhidro 0.26 g

Fosfato de potasio dibásico anhidro 2.14 g

Tripsina 0.1 g

Ajustar pH 7.2, aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril, filtrar con membrana de 0.22 μm y hacer alícuotas.

- Glicina

Pesar 0.15 g y disolver en 10.0 mL de ASF pH 7.0. La preparación se realiza en el momento de utilizarse.

- TDSET

Tris-HCl 1M pH 7.8 5.0 mL

Desoxicolato de sodio (DOC) al 10% 10.0 mL

Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% 2.5 mL

EDTA 0.5 M pH 8.0	10.0 mL
Tritón X-100 100%	5.0 mL
Agua bidestilada estéril cbp	500 mL

Homogenizar perfectamente y almacenar a temperatura ambiente (dura de 2 a 3 meses)

APÉNDICE I

SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO DE LIGANDOS-PROTEINASA

SACAROSA-ASF

Pesar 10.0 g de sacarosa y disolver en ASF pH 8.0 estéril mediante agitación. Agregar una pizca de colorante rojo de fenol. Guardar a 4°C.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA 2X

β -mercaptoetanol	50 μ L
Azul de bromofenol (stock 10 mg/mL)	50 μ L
Agua desionizada estéril	400 μ L

Distribuir en alícuotas y guardar a 4°C hasta su uso.

APÉNDICE J

SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

(Stock 8X)

Trisma-base 0.2 M	12.11 g
Glicina	57.68 g
Aforar a 500 mL con agua bidestilada estéril. Almacenar a 4°C.	

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA 1X

Stock 8X	250.0 mL
Metanol	400.0 mL
Agua bidestilada estéril	1350.0 mL

SOLUCIÓN BLOQUEADORA PARA TRANSFERENCIA

Albúmina sérica bovina	3.0 g
Amortiguador salino de fosfatos pH 7.3 cbp	100.0 mL
Disolver la albúmina dejando en agitación toda la noche a 4°C.	

SUSTRATO

Amortiguador salino de fosfatos pH 7.3	20.0 mL
{4 cloro 1 naftol en metanol absoluto (stock: 3 mg/mL)	4.0 mL
Peróxido de hidrógeno al 30%	8 µL
Preparar justo antes de utilizarse.	