

### **5.19. Ensayos de Activación del Proteosoma de *G. intestinalis*.**

Para evaluar el efecto de varios activadores del 20S proteosoma de eucariotas sobre el proteosoma de *G. intestinalis*, muestras de extractos crudos de proteína de trofozoítos preparados como se describió en 5.11. y el 20S parcialmente purificado del parásito fueron incubadas con diferentes concentraciones de PA28 $\alpha$  (0,02—0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), PA700 (0,02—0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), ATP y  $\text{MgCl}_2$  y bajas concentraciones de SDS (0,01 – 0,1%).

Ensayo de activación con PA28 $\alpha$ : se utilizó PA28 purificado de bovino en el laboratorio del Profeso George DeMartino (la solución base tenía una concentración de 2,9  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Se preparó una solución de activación con volumen final 50  $\mu\text{L}$  y la cual incluía: 5 $\mu\text{L}$  de *buffer* de reacción o *Master mix* (45 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5,6 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0,1 mM ATP), proteosoma a activar (volumen normalizado de extracto proteico o muestra que contenía el proteosoma a activar o el control positivo con m52 20S, generalmente se emplean 5  $\mu\text{g}$  de 20S puro), volumen del activador PA28 $\alpha$  (0,02—0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se completa a 50  $\mu\text{L}$  con buffer H 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 20mM NaCl, 1mM EDTA y 5 mM  $\beta\text{ME}$ ). Esta mezcla de activación se incubó por 20 min. a 37  $^\circ\text{C}$  y entonces fue analizada por un ensayo de actividad como se describió previamente en 5.13 se evaluó la actividad CTL y la actividad CL.

Ensayo de activación con PA700: se utilizó PA700 purificado de bovino (TA572 PA700) el protocolo de activación es igual al descrito para PA28 $\alpha$  y se evaluaron concentraciones de PA700 de 0,02—0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Ensayo de activación con ATP y  $\text{MgCl}_2$ : a cada muestra a activar se le adicionó una solución que contenía ATP/ $\text{MgCl}_2$ , los dos compuestos provenían de soluciones base diluidas en agua destilada desionizada. Las concentraciones ensayadas fueron 1 mM/10 mM y 0,2 mM/20 mM. Se prepararon soluciones de reacción de volumen final 50  $\mu\text{L}$  que contenían: muestra a activar, ATP/ $\text{MgCl}_2$  y Buffer H1X. Esta solución se preincubó por 20 min. a 37  $^\circ\text{C}$  y entonces fue analizada mediante el ensayo de actividad, como se describió previamente, se evaluó la actividad CTL y la actividad CL.

Ensayo de activación con SDS: el protocolo de activación con SDS es igual al descrito para ATP/ $\text{MgCl}_2$ . Se evaluaron concentraciones bajas de SDS de 0,01 a 0,1 % (v/v).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Purificación de Ubiquitina:

Ubiquitina de *G. intestinalis* fue purificada por un método de tres pasos que aprovecha la termoestabilidad de esta proteína y su solubilidad en una solución de ácido perclórico 5%. Luego de electroforesis preparativa SDS-PAGE con *buffer* Tris-Tricina, fue posible obtener hasta 1 mg de ubiquitina pura a partir de un cultivo de  $10 \times 10^9$  trofozoítos. En la figura 15A y 15B se observa el seguimiento a la purificación de ubiquitina. Durante todo el proceso es evidente una banda de peso molecular  $\sim 8,5$  kDa, la cual migra a la misma altura de la ubiquitina comercial de origen bovino (Fig. 15A, carril 6), la identidad de la ubiquitina fue corroborada por un ensayo de *western blot* (Fig. 15B), empleando un anticuerpo policlonal antiubiquitina.

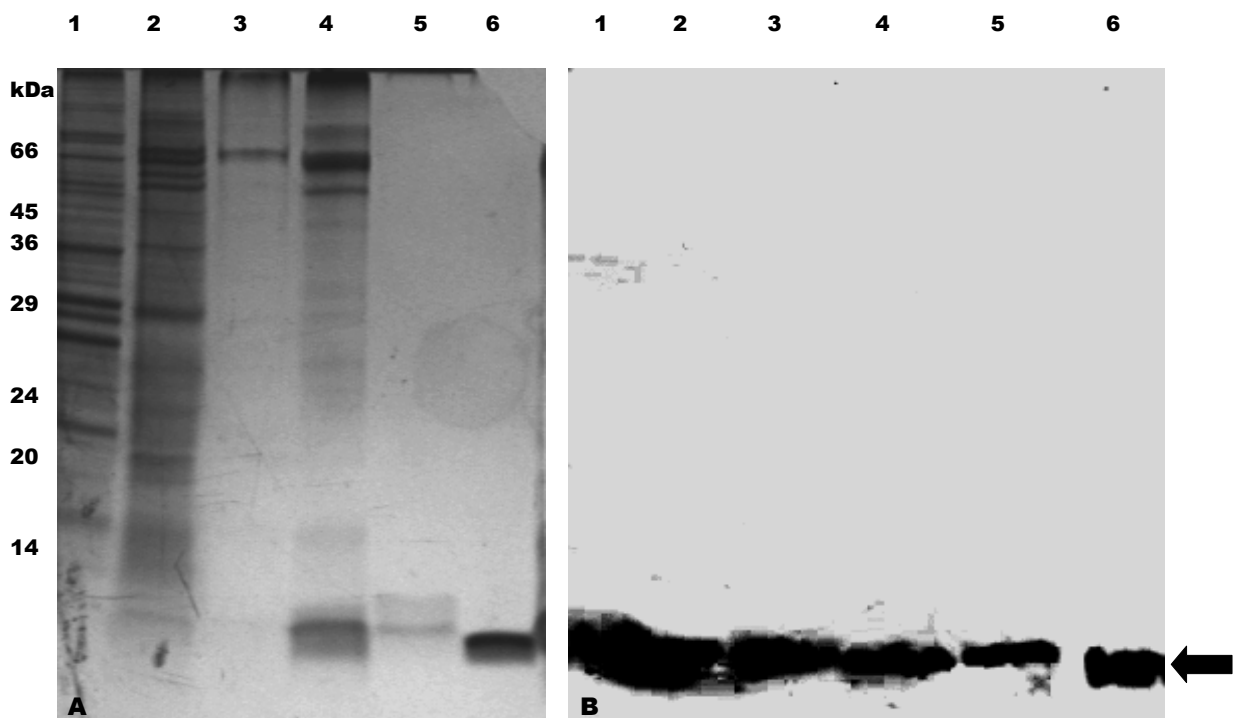


Figura 1. **Purificación de Ubiquitina.** **A.** SDS-PAGE T:18% en gel Tris tricina, teñido con plata (Silver Stain Plus. BioRad. Hercules, CA). 1. 30 ug de extracto proteico de trofozoítos; 2. Sobrenadante post-calentamiento; 3. Sobrenadante post-precipitación con ácido perclórico; 4. *Pellet* post-precipitación con ácido tricloroacético (TCA); 5. Ubiquitina pura extraída de gel luego de electroforesis preparativa; 6. Ubiquitina comercial 0,1 ug. **B.** Correspondiente ensayo de *Western blot* del gel de electroforesis A, se empleo anticuerpo anti-ubiquitina: Anti-UbGi 1:2.000; **kDa.** Marcador de bajo peso molecular para proteínas. La flecha de la derecha señala ubiquitina.

## **6.2. Producción de anticuerpos contra ubiquitina**

Los sueros obtenidos durante el proceso de inmunización, reconocieron ubiquitina pura de *G. intestinalis* y ubiquitina comercial de origen bovino respectivamente, empleando ensayos de *western blot* con 100 ng de ubiquitina. Este reconocimiento se observó 30 días después de la primera inoculación. A los 45 días mostraron títulos de 1:5.000 en ambos casos y se mantuvo la detección empleando diluciones mayores de los sueros lo cual evidenció el aumento del título de los anticuerpos y su especificidad por la ubiquitina usada como antígeno. Para ninguna de las diluciones estudiadas se apreció detección de ubiquitina por el suero preinmune, confirmando así que la detección se debió al proceso de inmunización. Se determinaron variables como dilución óptima de los anticuerpos policlonales producidos (1:1.000 para antiubiquitina de *Giardia*, Anti-UbGi y 1:2.000 para antiubiquitina bovina, Anti-UbBo), además se determinó la cantidad de extracto o número de parásitos adecuado para la detección específica de ubiquitina y proteínas ubiquitinadas (Fig. 16 y Fig. 17). 100.000 trofozoítos y 5 µg de extracto proteico son suficientes para una adecuada detección de ubiquitina y conjugados ubiquitina-proteína en *G. intestinalis*. Esta detección fue específica para los anticuerpos producidos como se evidencia en un *western blot* con el suero preinmune del Anti-UbGi (Fig. 18). A pesar del fuerte reconocimiento de cada uno de los anticuerpos por su respectivo antígeno y de la alta identidad en la secuencia de ubiquitina de *G. intestinalis* y ubiquitina bovina, 86,84% (Fig. 19), cuando se realizaron ensayos de inmunodetección cruzados, el anticuerpo contra ubiquitina bovina no reconoció la ubiquitina pura de *G. intestinalis* (0,1 µg) y tampoco la detectó en extractos proteicos (70 µg) o trofozoítos completos (500.000 células) del parásito (Fig. 20B). Sin embargo, el anticuerpo contra ubiquitina de *G. intestinalis* detecta hasta 20 ng de ubiquitina comercial de origen bovino (Fig. 20A). Dada la alta identidad entre las secuencias de aminoácidos de la ubiquitina de origen bovino y la ubiquitina de *G. intestinalis* era de esperarse detección cruzada por los anticuerpos generados; sin embargo, es posible que la respuesta inmune haya sido dirigida preferencialmente hacia la parte menos conservada de la molécula, la cual contiene los aminoácidos diferentes. Según Tèlles y Colaboradores (1999), las diferencias en aminoácidos aparentemente lejanos en la estructura primaria de ubiquitina, generalmente están muy relacionados en la estructura tridimensional de la proteína y pueden ser parte de un determinante antigénico conformacional que generalmente es especie-específico.

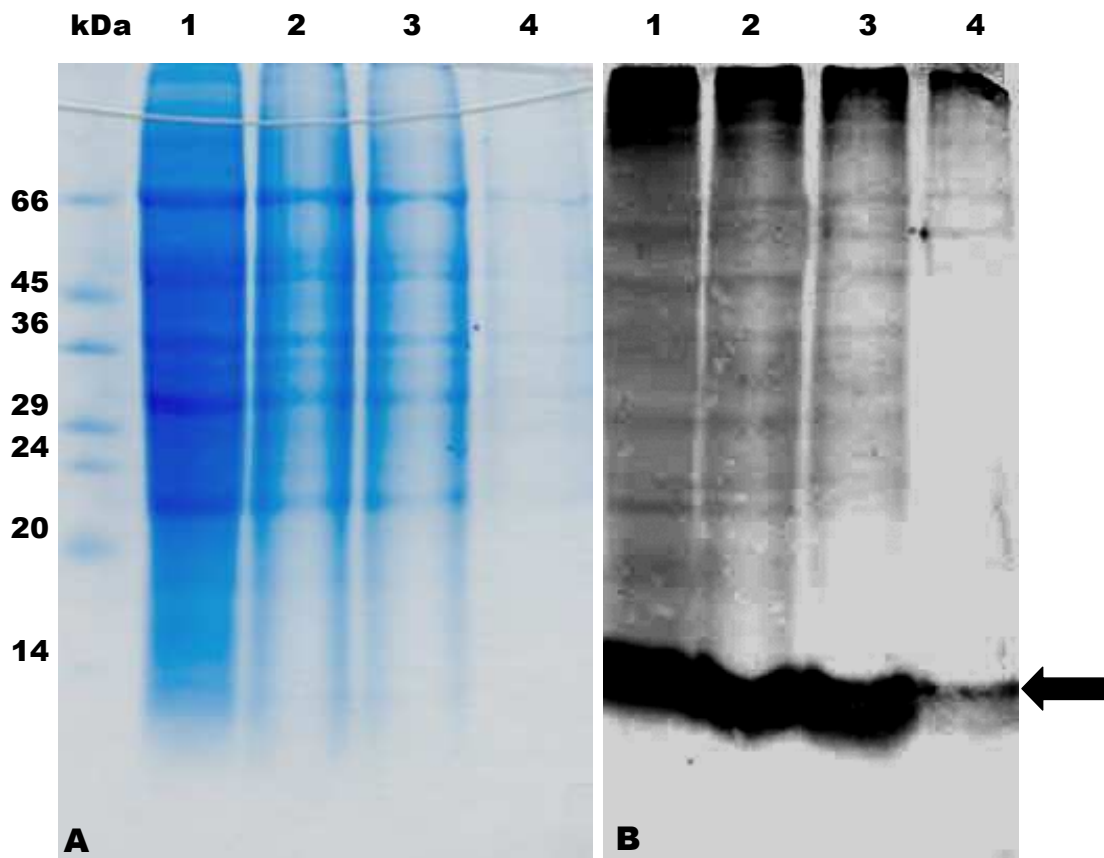


Figura 16. Detección de Ubiquitina en trofozoítos de *G. intestinalis*. **A.** SDS-PAGE T:18% en gel Tris tricina, teñido con solución de Coomassie. 1.  $2 \times 10^6$  parásitos; 2.  $1 \times 10^6$  parásitos; 3.  $5 \times 10^5$  parásitos; 4.  $1 \times 10^5$  parásitos. **B.** Correspondiente ensayo de *western blot* del gel de electroforesis A. Se empleó Anti-UbGi 1:1.000. **kDa.** Marcador de bajo peso molecular para proteínas. La flecha de la derecha señala ubiquitina.

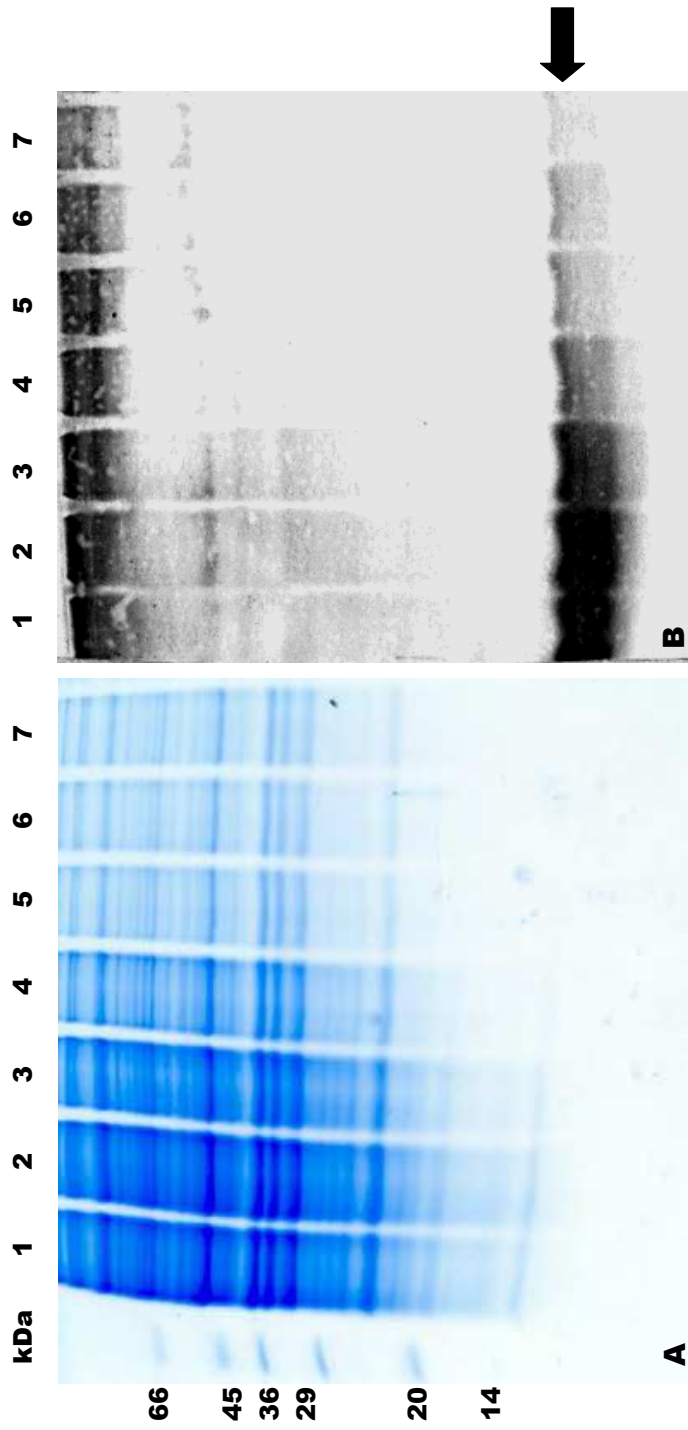


Figura 17. **Detección de Ubiquitina sobre extractos de proteína de trofozoítos de *G. intestinalis*.**  
**A.** SDS-PAGE T:18% en gel Tris tricina, teñido con solución de Coomassie. Concentraciones de  
 crecientes de proteína así: 1. 80 ug; 2. 60 ug; 3. 40 ug; 4. 20 ug; 5. 10 ug; 6. 5 ug; 7. 2 ug. **B.**  
 Correspondiente ensayo de western blot del gel de electroforesis A, se empleó Anti-UbGi  
 1:1.000. **kDa**, Marcador de bajo peso molecular para proteínas. La flecha de la derecha señala  
 ubiquitina.

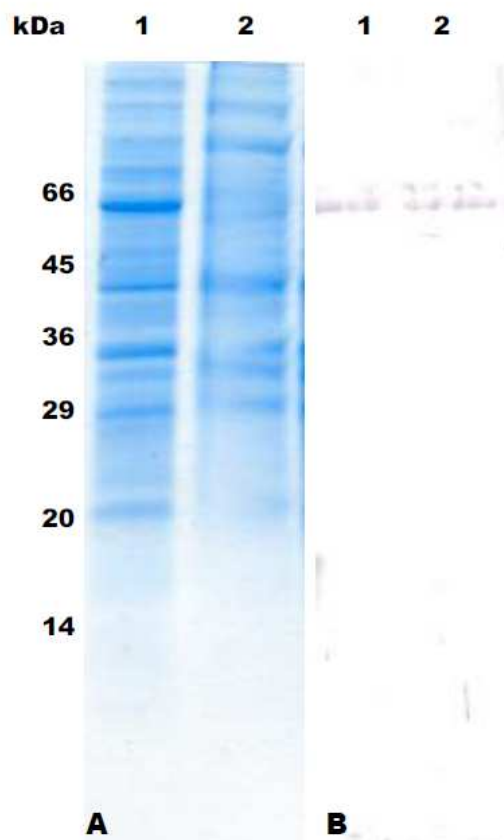


Figura 18. Control Negativo. Patrones de Ubiquitinación. A. SDS-PAGE T:18% en gel Tris tricina, teñido con solución de Coomassie. 1. Extracto de proteína, 20 ug; 2.  $5 \times 10^5$  parásitos. B. Correspondiente ensayo de *western blot* del gel de electroforesis A, se empleó Suero preimmune 1:1.000. **kDa**, Marcador de bajo peso molecular para proteínas.

10    20    30    40    50    60    70

Giardia  
QIFVKLTGKVTLEVEPTDTINN**IK**AKIQDKEGIPPDQ**QRLIF**SGKQLEDNRTLQDY**SIQK**DATLHLVLR**LRGG**

Bovine  
MQIFVKLTGKTIT**LE**VEPS**DTI**ENV**KAKI**QDKEGIPPDQ**QRLIF**AGKQLEDG**RTLSDY**NI**KES**TLHLVLR**LRGG**

\*\*\*\*\*.\*.....\*.\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*.....\*

Prim.cons.  
MQIFVKLTGKT2TLEVEP2DTI2N2**KAKI**QDKEGIPPDQ**QRLIF**2GKQLED2RTL2DY2IQK22TLHLVLR**LRGG**

Figura 19. **Alineamiento entre ortólogos de Ubiquitina.** Empleando el programa ClustalW se realizó el alineamiento entre las secuencias de Ubiquitina de los organismos *Bos taurus* y *G. intestinalis*. La identidad fue de 86,84%.

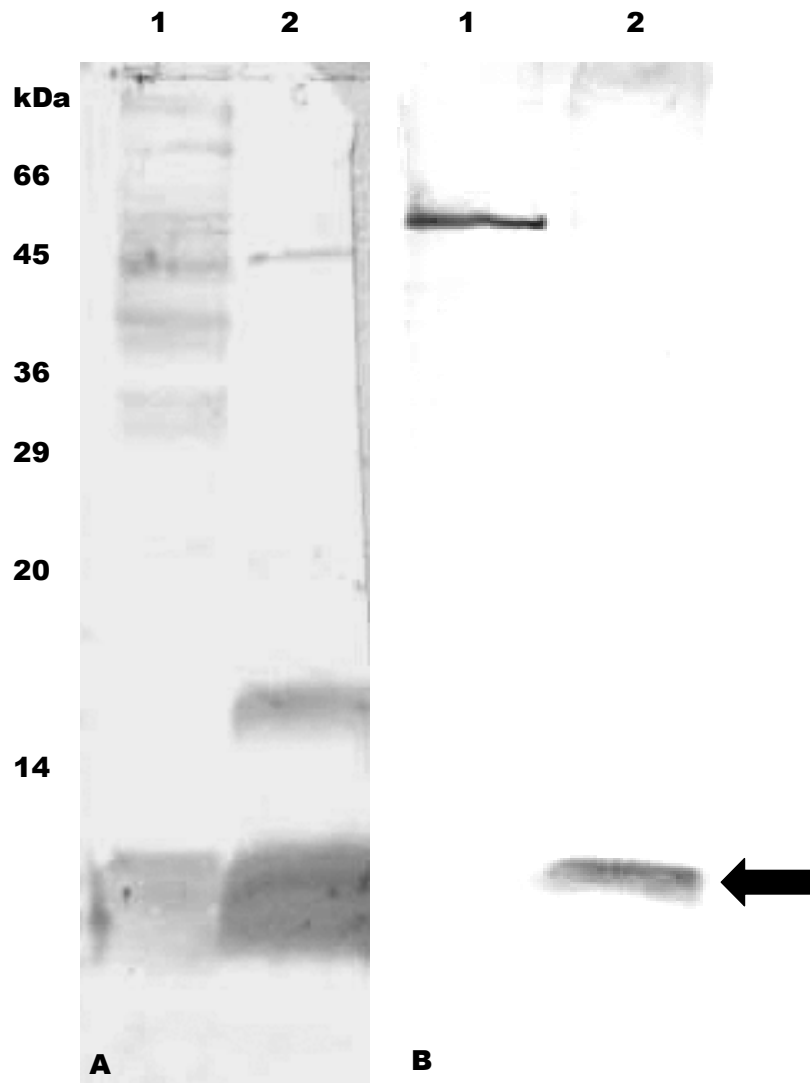


Figura 20. **Ensayos de Inmunodetección cruzados.** **A.** *Western blot* con Anti-UbGi 1:1000. 1. Extracto de proteína de trofozoítos (30 ug), 2. Ubiquitina Bovina (Sigma), 20 ng. **B.** *Western blot* con Anti-UbBo 1:1000. 1. Extracto de proteína de trofozoítos (70 ug), 2. Ubiquitina Bovina (Sigma), 20 ng .



### 6.3. Inmunodetección-Patrones de Ubiquitinación:

La inmunodetección mediante ensayos *western blot* con el anticuerpo Anti-UbGi permitió determinar la expresión y distribución de ubiquitina total, tanto en su forma de ubiquitina libre (monoubiquitina) y ubiquitina conjugada a proteínas sustrato. La evaluación se realizó en extractos proteicos de trofozoítos y extractos proteicos del proceso de enquistación. La expresión de monoubiquitina es constante durante la mayor parte del proceso de enquistación de *G. intestinalis*, sin embargo hay una ausencia total de ubiquitina en la fracción citoplasmática del extracto proteico a las 48 h (Fig. 21) lo cual podría sugerir una conjugación de ubiquitina a proteínas asociadas con el proceso de enquistación o una re-localización de esta proteína del citoplasma del parásito a las paredes del quiste. Stefanic y Colaboradores (2006) reportaron la asociación del 26S proteosoma con las ESVs (vesículas específicas de enquistación) y demostraron la re-localización de esta proteasa multicatalítica hacia la periferia del parásito durante las fases tempranas de la enquistación, por lo cual es posible plantear que la maquinaria de ubiquitinación pueda sufrir el mismo proceso. Al evaluar la presencia de conjugados ubiquitina-proteína se identificó un patrón de ubiquitinación en la región de alto peso molecular (Fig. 21B), este resultado indica que el proceso de ubiquitinación es activo en *G. intestinalis* durante el estadio de trofozoíto (Fig. 16 y Fig 17) y durante el proceso de enquistación (Fig. 21).

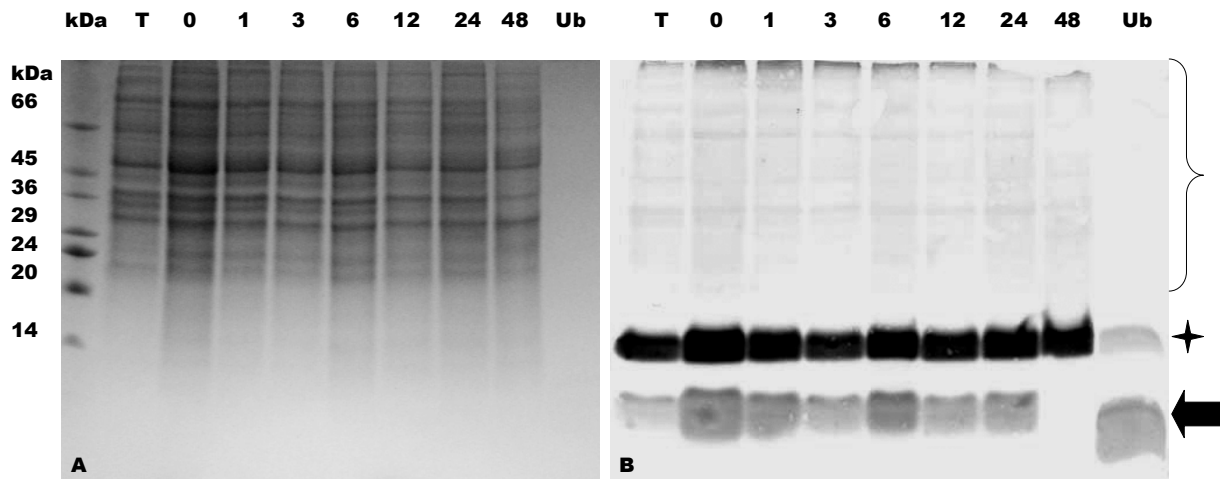


Figura 21. **Patrones de ubiquitinación durante la enquistación.** **A.** SDS-PAGE en gel Tris Tricina T:18%, teñido con Coomassie. 30 mg de extracto de proteína en cada carril. T. trofozoítos; 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas del proceso de enquistación, Ub. 1,000 ng de Ubiquitina comercial de origen bovino (Sigma). **B.** Correspondiente ensayo de *Western blot* de la electroforesis A. Como control de carga, se empleó Calmodulina, usando el anticuerpo policlonal Anti-Cam 1:2000. El anticuerpo Anti-UbGi fue utilizado en una dilución 1:1000. El corchete indica la presencia de conjugados ubiquitina-proteína. La flecha señala ubiquitina. La estrella indica la detección de Calmodulina en los carriles T a 48, a este mismo nivel en el carril de Ub comercial se observa diubiquitina.

#### **6.4. Inhibición de la enzima activadora de ubiquitina E1.**

Con el fin de evaluar la participación del proceso de ubiquitinación durante la fase de división activa de los trofozoítos de *G. intestinalis*, se evaluó el efecto de la inhibición de la enzima activadora de ubiquitina E1, empleando el único inhibidor permeable en células eucariotas descrito hasta ahora, PYR-41 o UBEI-41. Este inhibidor ha mostrado que inhibe directamente E1 sin afectar E2, con una concentración inhibitoria 50% (IC50%) <10 µmol/L. En concentraciones de 50 µmol/L, se obtiene una inhibición del 95%, en un periodo de 3 a 5 minutos de tratamiento, en ensayos *in vitro* (Yang et al, 2007). Luego de tratamientos en células eucariotas se ha observado un IC50% de ~ 5 µM (Biogenova, Corp. USA). En cultivo de trofozoítos de *G. intestinalis* se evaluaron dos concentraciones del inhibidor: 20 µM y 50 µM por un periodo de 24 horas y no se observaron cambios en el crecimiento y viabilidad de los parásitos tratados con UBEI-41 comparado con los controles (Fig. 22). Estos resultados pueden tener dos explicaciones: Primero, existe una alta divergencia entre las secuencias de la enzima E1 de eucariotas superiores y la secuencia de E1 de *Giardia* (Fig. 23), por lo cual es posible pensar que este inhibidor no tenga la misma actividad sobre el sitio activo de la enzima E1 de este protozoario. Aunque no se conoce en detalle el mecanismo de acción de UBEI-41; su estructura, la aparente irreversibilidad de su efecto y la reducción de su actividad en presencia de un exceso de tioles libres sugieren que UBEI-41 puede ser blanco de ataque nucleofílico y potencialmente puede reaccionar con el sitio activo cisteína de E1 (Yang et al, 2007). Estudios de la relación estructura-actividad establecerán de forma definitiva la base molecular de cómo UBEI-41 inhibe E1 y con este conocimiento se podrá evaluar la afinidad de este inhibidor con diferentes enzimas E1 en organismos eucariotas. Segundo, recientemente se describió que ubiquitina puede ser activada por dos enzimas E1 diferentes, la enzima activadora de ubiquitina 1 (UBE1) y UBA6 (Chiu et al, 2007, Pelzer et al, 2007). Además, en *G. intestinalis*, Gallego y Colaboradores (2007) identificaron dos enzimas activadoras de ubiquitina E1, una identificada como un ortólogo de la E1 de conejo y la otra identificada como un ortólogo de una enzima E1 putativa de *Arabidopsis thaliana*, estas dos enzimas mostraron ser completamente diferentes con una identidad de tan solo 9,72% y recientemente Castellanos (2009) reportan la presencia de dos genes MoeB en el genoma de *Giardia*, las proteínas MoeB han sido postuladas como enzimas activadoras E1 ancestrales en bacterias (Lyer et al, 2004). Esta información previa puede indicar que la activación de ubiquitina por enzimas E1 en *G. intestinalis* puede realizarse por dos o más vías, evento que ya se ha comprobado en eucariotas superiores (Pelzer et al, 2007). De esta manera se puede postular que

la inhibición de una de estas enzimas E1 por UBEI-41, podría ser compensada por la actividad de otra enzima activadora E1 y por tanto no es posible visualizar efecto sobre el cultivo de trofozoítos luego de tratamiento con este inhibidor. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales de estructura y actividad de las enzimas E1, para elucidar de forma específica el proceso de activación de ubiquitina en *Giardia*.

Luego de evaluar el efecto de UBEI-41 sobre los patrones de ubiquitinación, mediante ensayos *western blot*, no se observó, como era de esperarse, una disminución en el número de conjugados ubiquitina-proteína en la región de alto peso molecular, y por el contrario cuando los parásitos fueron tratados con 50  $\mu$ M de UBEI-41 fue evidente una leve acumulación de conjugados ubiquitina-proteína en los parásitos tratados con respecto al control y este incremento fue mayor con el tiempo (Fig. 24B). Un resultado similar fue reportado por Yang y Colaboradores (2007), ellos encontraron que después de tratamientos con UBEI-41 se aumenta la presencia de conjugados ubiquitina-proteína en el área de alto peso molecular en células humanas, junto con un incremento en la sumoilación en las células tratadas. Las razones de este efecto sobre los patrones de ubiquitinación y sumoilación son aún desconocidas, pero pueden estar relacionadas con interacciones recíprocas entre ubiquitinación y otras vías de señalización que incluyen sumoilación y fosforilación (Yang et al, 2007). En el caso de *G. intestinalis* se puede postular que posterior a la inhibición de una de la(s) enzima(s) E1, se active(n) otra(s) vías de ubiquitinación para compensar el efecto inhibitorio de UBEI-41 y de esta forma se observe un incremento en la conjugación de ubiquitina a sus sustratos, más que la esperada ausencia de ubiquitinación. Estos resultados indican que muy probablemente los mecanismos de activación de ubiquitina y su regulación son más complejos de lo que hasta ahora se pensaba.

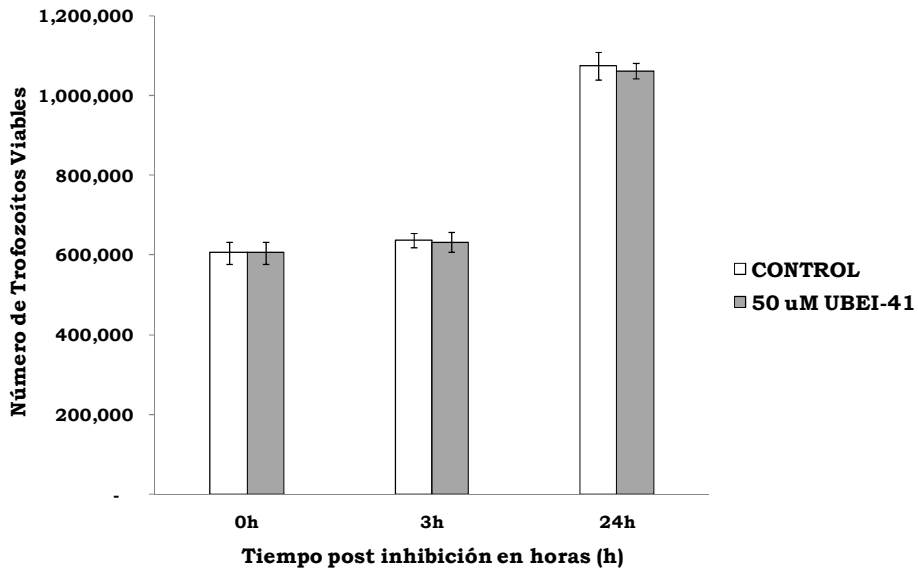


Figura 22. Crecimiento de trofozoitos de *G. intestinalis* después de la incubación con 50  $\mu$ M de UBEI-41 por 3 y 24 horas. Se incluyeron controles adicionales con DMSO en todos los ensayos. El número de trofozoitos viables en cada punto representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo con triplicado.

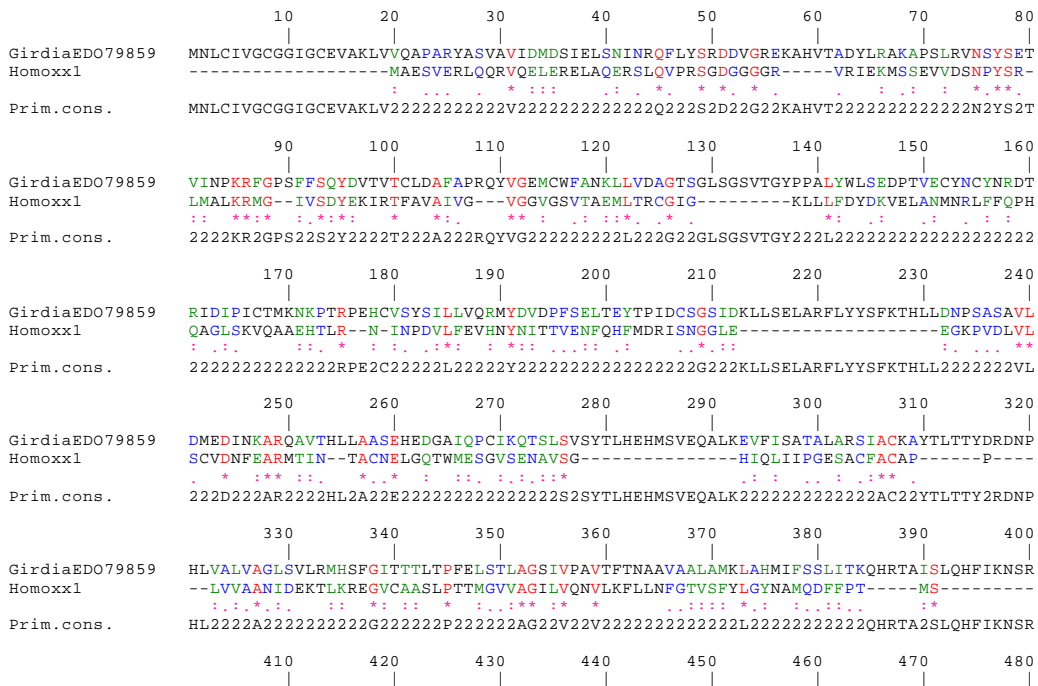


Figura 23. Alineamiento entre ortólogos de la Enzima Activadora de Ubiquitina, E1. Empleando el programa ClustalW se realizó el alineamiento entre las secuencias de E1 de los organismos *H. sapiens* y *G. intestinalis*. La identidad fue de 10,78%.

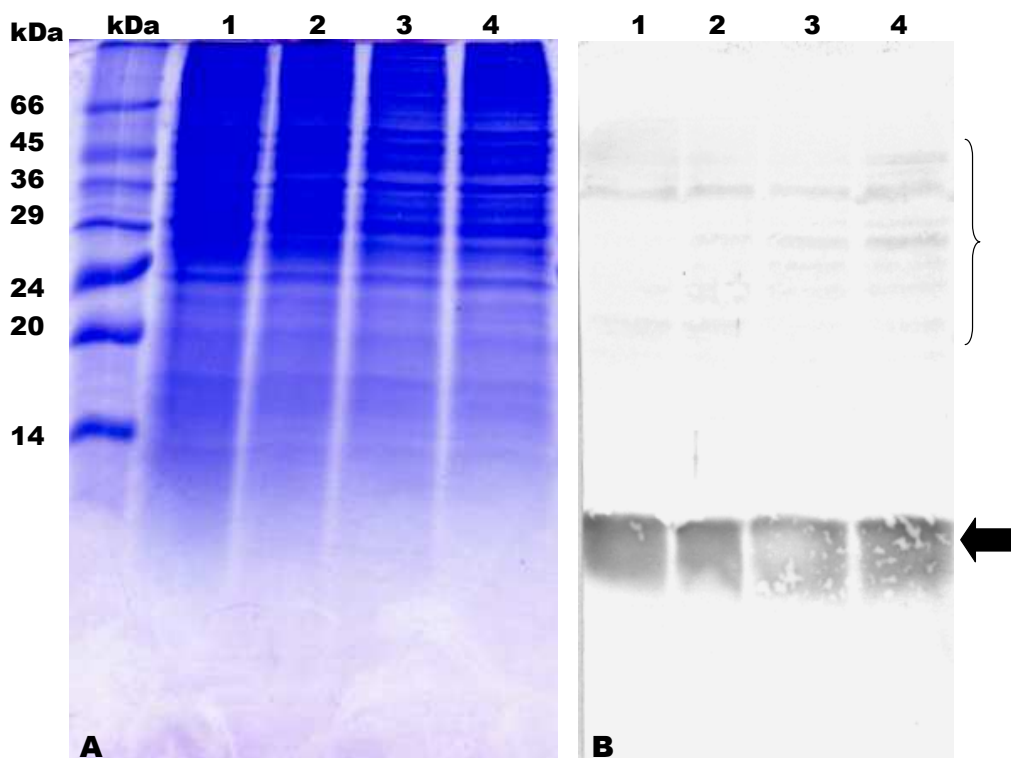


Figura 24. **Ensayo de Inhibición de E1 en *G. intestinalis***. Cultivos de trofozoítos con 24 h de establecimiento fueron expuestos a 50  $\mu$ M de UBEI-41 o DMSO. Se evaluó el efecto sobre los patrones electroforéticos y los conjugados ubiquitina-proteína a las 3h y 24 h post-tratamiento. **A.** SDS-PAGE T:15% en gel Tris-Glicina, teñido con solución de Coomassie. Se ajustó la concentración de parásitos a 500.000 células/pozo. 1. Control con DMSO 3h, 2. Tratado con UBEI-41 3h, 3. Control con DMSO 24h, 4. Tratado con UBEI-41 24. **B.** Correspondiente ensayo de *Western blot* del gel A, se evaluaron los patrones de ubiquitinación con Anti-UbGi 1:1000. **kDa.** Marcador de bajo peso molecular para proteínas. El corchete señala los conjugados ubiquitina-proteína. La flecha señala Ubiquitina.

## **6.5. Efecto de la Inhibición del Proteosoma sobre el Crecimiento y Viabilidad de los Trofozoítos de *G. intestinalis*.**

El efecto de varios inhibidores del proteosoma sobre el crecimiento y viabilidad en cultivo de trofozoítos de *G. intestinalis* se resume en las figuras 25 y 26. No se observó efecto sobre el crecimiento y viabilidad de los trofozoítos de *Giardia* a las 6h post-tratamiento (Fig. 25); mientras que se evidenció una reducción en el recuento de parásitos a las 24 h y 48 h (Fig. 25A), pero en ningún caso hubo cambios en la morfología y viabilidad celular. Así, la reducción en el número de trofozoítos viables post-tratamiento es aparentemente causada por un incremento en el tiempo de replicación celular, como lo indica el cálculo del número de duplicaciones (Fig. 25B) y no por un incremento en la mortalidad celular. Los parásitos tratados con inhibidores muestran una reducción entre 0,1 y 0,3 en sus duplicaciones a las 24 h y entre 0,1 y 0,2 a las 48 h (Fig. 25B). Al expresar los resultados en porcentaje de inhibición del crecimiento de los grupos inhibidos y sus controles, se observó que a las 6 h el porcentaje de inhibición es inferior al 2%, a las 24 h y 48 h el porcentaje de inhibición es inferior al 15%. El inhibidor con mayor efecto sobre el crecimiento de *G. intestinalis* fue clasto lactacistina  $\beta$  lactona, en concentraciones de 20  $\mu$ M, el porcentaje de inhibición fue de 13,74% a las 24 h y de 12,38% a las 48 h (Fig. 26) y con concentraciones de 50  $\mu$ M su porcentaje de inhibición fue de 14,25% a las 24 h y de 11,85% a las 48 h (datos no mostrados). Beta lactona es el intermediario activo y permeable en células eucariotas de lactacistina y resulta de la ciclización espontánea, en soluciones acuosas con pH neutro, de lactacistina con pérdida del grupo N-acetilcisteina (Fenteany et al, 1995); este inhibidor tiene actividad inhibitoria irreversible sobre los tres sitios activos del proteosoma (Fenteany et al, 1995). Por otro lado su precursor, lactacistina, fue el inhibidor con menor efecto sobre el crecimiento de trofozoítos de *Giardia*, con un porcentaje de inhibición de 4,8% a las 24 h y de 3,5% a las 48h; esta diferencia no se debe a la concentración de lactacistina empleada (10  $\mu$ M) ya que en experimentos preliminares (datos no mostrados) el efecto fue similar con concentraciones de lactacistina de hasta 50  $\mu$ M. En el análisis de las diferencias encontradas en la actividad de estas dos formas de este inhibidor, debe considerarse que: 1) clasto lactacistina  $\beta$  lactona es la forma permeable y activa de lactacistina en las células eucariotas, 2) se ha demostrado que la forma lactonada actúa entre 15 a 20 veces más rápido que lactacistina (Fenteany et al, 1998), 3) el derivado  $\beta$  lactona tiene una efectividad de 2 a 4 veces mayor a su precursor lactacistina (Craiu et al, 1997), 4) existen reportes de influencia del medio de cultivo en la tasa de conversión de lactacistina a su forma  $\beta$  lactona (Lee & Goldberg 1996; Dick et al, 1997) y 5) hay información de

baja actividad de lactacistina en algunos sistemas celulares como cultivo de levaduras y sensibilidad diferencial entre formas parasitarias de *Leishmania mexicana*, al parecer por diferencias cruciales para su metabolismo en el medio y/o deficiencias en su capacidad de penetración celular (Lee y Goldberg 1996; Robertson 1999). Muy probablemente algunos, sino todos, estos factores están participando en las diferencias observadas en la eficiencia de inhibición de ambos compuestos sobre el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*. Estos resultados son consistentes con algunos estudios donde el efecto inhibitorio de lactacistina sobre sistemas celulares es muy inferior al observado por su metabolito  $\beta$  lactona (Lee & Goldberg 1996; Craiu et al, 1997; Silva-Jardim et al, 2004).

Epoxomicina es considerado un inhibidor del proteosoma muy potente y el más específico (Sin et al, 1999; Meng et al, 1999); en este estudio con una concentración de 1  $\mu$ M su efecto no fue muy marcado, encontrando una reducción en el número de duplicaciones de tan solo 0,2 a las 24 h y de 0.1 a las 48 h, con porcentajes de inhibición de 11,43% a las 24 h y 11,82% a las 48 h y sin efectos evidentes en la morfología y viabilidad de los trofozoítos. Se observó un leve incremento en el porcentaje de inhibición a las 48 h que puede estar relacionado con su actividad irreversible sobre las subunidades catalíticas del 20S proteosoma. Finalmente el tratamiento con el péptido aldehído, MG132, en una concentración de 50  $\mu$ M mostró igualmente efectos muy leves sobre el cultivo de *G. intestinalis*, con una reducción en el número de duplicaciones de 0,2 a las 24 h y 0,1 a las 48 h, y porcentajes de inhibición de 10,74% a las 24 h y 9,01% a las 48 h. La disminución en el porcentaje de inhibición a las 48 h puede estar asociada con la tasa de disociación rápida de este compuesto. En células eucarióticas esta clase de inhibidores son rápidamente oxidados a ácidos inactivos y transportados fuera de la célula por el sistema transportador de resistencia a medicamentos (*multi-drug resistance*-MDR) (Kisselev y Goldberg 2001).

Estos resultados indican que estos cuatro inhibidores del proteosoma causan una reducción leve en el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*, sin afectar la viabilidad celular durante 48 h post-tratamiento. Se ha descrito ampliamente que el tratamiento con inhibidores del proteosoma sobre diferentes sistemas celulares tiene efectos biológicos muy diversos, dependiendo del proceso que sea preferencialmente afectado. De esta manera el efecto final de la inhibición selectiva del proteosoma depende de varios parámetros tales como: el tipo de célula, el estado de proliferación celular, la naturaleza y dosis de los inhibidores y el tiempo de exposición, entre otros (Meiners et al, 2007; Borissenko & Groll 2007). En este experimento evaluamos el efecto de los

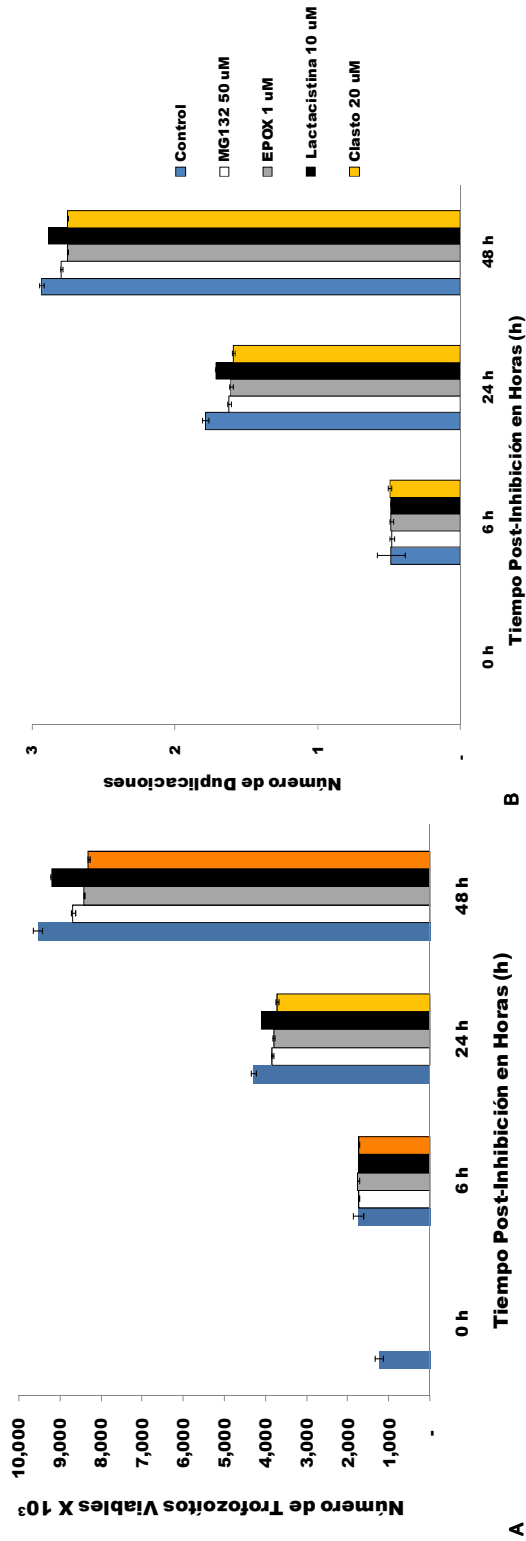
inhibidores del proteosoma en la forma vegetativa del parásito, la cual tiene una replicación activa, estudios previos en células eucarióticas han determinado que la efectividad de los inhibidores del proteosoma es mayor y más rápida (4 a 48 h) en células en división activa cuando se compara con células quiescentes (Drexler et al, 1997; Wojcikc 1999). Además, al comparar nuestros experimentos con varios estudios similares en diferentes tipos de células eucarióticas, es importante resaltar, que tanto los inhibidores como las concentraciones inhibitorias empleadas en nuestro estudio son considerados efectivos en la generación de alteraciones importantes del ciclo celular, que generalmente desencadenan vías de señalización proapoptóticas (Lin et al, 1998; Stasiolek et al 2000; Stangl et al 2004; Meiners et al, 2006; Kisselev et al 2006) y por tanto causan efectos marcados sobre el crecimiento y la viabilidad celular, características ausentes en nuestras observaciones. Sin embargo debe considerar que se desconocen los efectos directos de cada uno de los inhibidores sobre las diferentes subunidades catalíticas del proteosoma y se sabe que la inhibición eficiente de la actividad proteolítica del proteosoma solo puede lograrse por la inhibición sostenida y simultanea de la actividad CTL y un segundo sitio activo, ya sea TL o CL. Solo la inhibición sostenida de múltiples sitios activos del proteosoma es citotóxica, mientras la inhibición parcial de su actividad CTL puede resultar en protección de las células tratadas (Kisselev et al, 2006; Meiners et al, 2007). Por lo anterior es necesaria la caracterización bioquímica y funcional de la actividad peptidasa de cada subunidad catalítica de la partícula 20S de *G. intestinalis*, para comprender completamente los efectos biológicos de los inhibidores del proteosoma sobre el ciclo de vida de este protozoario.

Finalmente, estos resultados contrastan con la mayoría de estudios publicados de inhibición del proteosoma en otros parásitos protozoarios, en los cuales se ha observado un efecto muy marcado de estos inhibidores sobre el crecimiento celular, la progresión del ciclo celular y la viabilidad. Algunos ejemplos son *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba invadens* (Makioka et al, 2002), *Trypanosoma cruzi* (Gonzalez et al, 1996; Cardoso et al, 2008), *Trypanosoma brucei* (Nkemgu-Njinkeng et al, 2002), *Plasmodium sp.* (Gantt et al, 1998; Certad et al, 1999; Mordmüller et al, 2006; Kreidenweiss et al, 2008) y *Toxoplasma gondii* (Shaw et al, 2000; Paugam et al, 2002).

El comportamiento de la curva de crecimiento, morfología, tiempo de duplicación y viabilidad de los trofozoítos de *G. intestinalis* frente a la inhibición selectiva del proteosoma pueden sugerir que este protozoario posee y activa muy rápidamente mecanismos compensatorios para superar la ausencia de actividad del proteosoma o bien que existen otras vías de degradación específica de proteínas que no hacen indispensable la degradación vía proteosoma durante la fase de



replicación activa del parásito. En células eucariotas se ha descrito la existencia de mecanismos compensatorios a la inhibición del proteosoma, pero siempre son activados luego de la inhibición prolongada del proteosoma (más de 48 h) (Meiners et al, 2003; Naujokat, Fuchs & Berges 2007). Por otro lado es muy interesante analizar que existen grandes similitudes entre los resultados descritos en este trabajo y varios estudios de inhibición del proteosoma en Archaea (Ruepp et al, 1998; Kirkland et al, 2007). Estos organismos poseen otras vías de degradación alternas que compensan la pérdida de la actividad del proteosoma y minimizan los efectos sobre el crecimiento y la viabilidad (DeMot et al, 1999). Así es posible pensar que *G. intestinalis* considerado un eucariota tempranamente divergente pueda poseer un sistema ubiquitina-proteosoma intermedio entre el eucariota y el procariota.



**Figura 25. Efecto de Inhibición del Proteosoma Sobre el Crecimiento de *G. intestinalis*.** Los parásitos fueron incubados por 48 h con cuatro inhibidores diferentes en las concentraciones señaladas, en cada experimento se incluyeron controles negativos adicionados con DMSO. **A.** Efecto de la inhibición del proteosoma sobre el número de trofozoitos viables durante 48 h de incubación. **B.** Efecto de la inhibición del proteosoma sobre el número de duplicaciones celulares, calculadas con la siguiente fórmula:  $\text{Log}[\text{Número de células en el tiempo final}/\text{Número de células en el tiempo inicial}]/\text{Log } 2$ . Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de un experimento representativo con triplicado. Cada experimento se realizó mínimo dos veces.

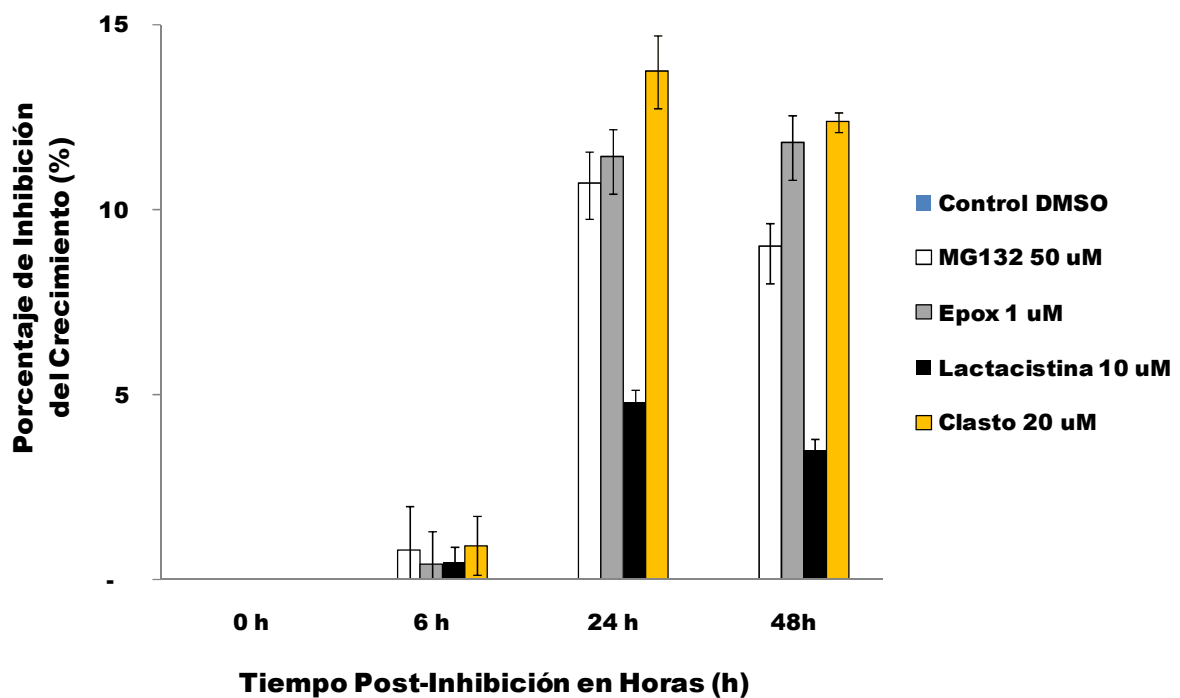


Figura 26. Efecto de Diferentes Inhibidores del Proteosoma Sobre el Porcentaje (%) de inhibición del crecimiento de *G. intestinalis*. Los parásitos fueron incubados por 48 h con cada uno de los inhibidores en las concentraciones señaladas, en cada experimento se incluyeron controles negativos adicionados con DMSO. El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la siguiente fórmula:  $[(\text{Número de células control en el tiempo indicado} - \text{Número de células tratadas en el tiempo indicado}) / \text{Número de células control en el tiempo indicado}] * 100\%$ . Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de un experimento representativo con triplicado. Cada experimento se repitió al menos dos veces.

## **6.6. Patrones de Ubiquitinación Post-Inhibición del Proteosoma en *G. intestinalis***

La consecuencia primaria de la inhibición del proteosoma es una reducción en la tasa de degradación de proteínas a nivel intracelular conduciendo a una acumulación de proteínas conjugadas a ubiquitina y de proteínas mal plegadas y dañadas (Kisselev y Goldberg 2001). En este trabajo se emplearon tres inhibidores del proteosoma para determinar su efecto sobre los patrones de ubiquitinación en trofozoítos de *G. intestinalis*. La adición de epoxomicina 1 $\mu$ M o MG132 50  $\mu$ M o lactacistina 10  $\mu$ M causó una acumulación de múltiples conjugados ubiquitina-proteína en la región de alto peso molecular, que se evidenció durante la evaluación de los patrones de ubiquitinación, mediante ensayos *western blot* con Anti-UbGi (Fig. 27). Los conjugados ubiquitinados fueron detectados desde 1 h post-tratamiento y su nivel se incremento con el tiempo. El inhibidor con mayor efecto sobre este parámetro fue MG132, epoxomicina mostró un efecto intermedio y lactacistina un efecto menor. La masa molecular de los conjugados ubiquitina-proteína acumulados varió de 50 a 250 kDa (Fig. 27). Estos resultados demuestran que los inhibidores ensayados penetraron los trofozoítos y bloquearon la degradación proteosomal de proteínas ubiquitinadas. Pero este efecto inhibitorio no generó alteraciones en la morfología y viabilidad de estos parásitos, como se discutió previamente (numeral 6.5). A pesar de que en nuestro modelo experimental los tiempos de tratamiento fueron cortos no se debe descartar que *G. intestinalis* utilice tempranamente algunos mecanismos adaptativos que se han descrito en células eucariotas sometidas a presión continua de inhibición del proteosoma como: modificaciones adaptativas del sistema proteosomal con incremento en la expresión de algunas subunidades, aumento de la actividad proteolítica, alteración del ensamblaje y composición de las subunidades de la partícula central (20S) y de la partícula regulatoria 19S (Meiners et al, 2003), también como la expresión de otros sistemas de proteólisis como el sistema Tripeptidil Peptidasa II, que se sabe compensa parcialmente las deficiencias en función del proteosoma en varios sistemas eucariotas (Naujokat, Fuchs & Berges 2007). Por otro lado debido a la temprana divergencia o reducción genómica de *G. intestinalis* es probable que posea algunas de las vías de degradación alternas presentes en Archaea y que compensan la pérdida de la actividad del proteosoma (DeMot et al, 1999).

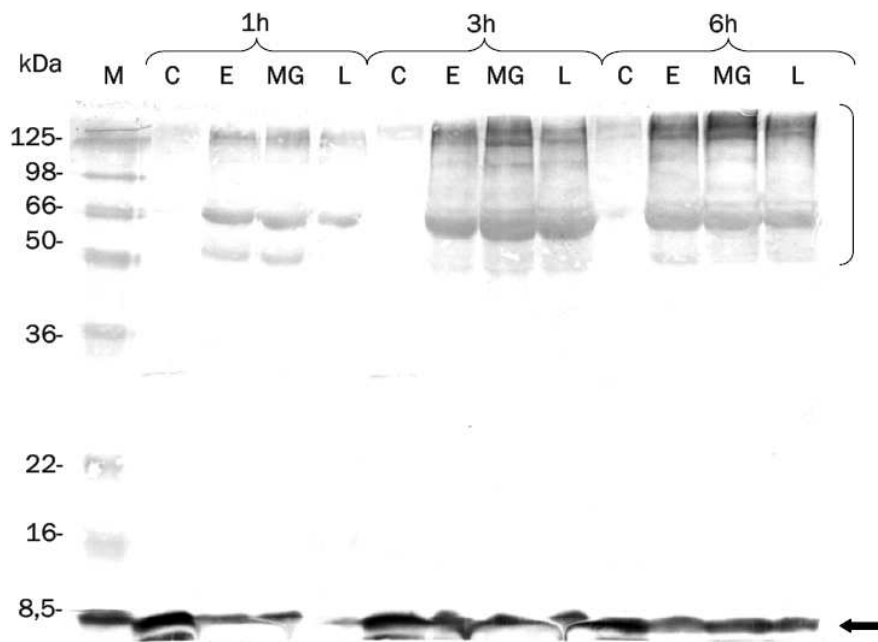


Figura 27. . **Efecto de Inhibición del proteosoma sobre los Patrones de Ubiquitinación.** Trofozoítos de *G. intestinalis* con 24 h de establecimiento fueron incubados con epoxomicina 1  $\mu$ M, MG132 50  $\mu$ M y lactacistina 10  $\mu$ M. Los parásitos fueron colectados 1 h, 3 h y 6 h post-tratamiento. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western blot* con anti-UbGi 1:1000. **M**, marcador de bajo peso molecular para proteínas; **C**, Control, con DMSO; **E**, parásitos tratados con epoxomicina, 1  $\mu$ M; **MG**, parásitos tratados con MG132, 50  $\mu$ M; **L**, parásitos tratados con lactacistina, 10  $\mu$ M; La flecha señala ubiquitina; El corchete muestra región de conjugados ubiquitina-proteína; **1 h, 3 h, 6 h**, tiempo post-tratamiento.

## **6.7. Efecto de la inhibición del Proteosoma sobre el Proceso de Enquistación de *G. intestinalis*.**

Para evaluar el papel del proteosoma de *G. intestinalis* durante el proceso de enquistación se evaluó el efecto de cuatro inhibidores del proteosoma: epoxomicina 1  $\mu\text{M}$ , MG132 50  $\mu\text{M}$ , lactacistina 10  $\mu\text{M}$  y clasto lactacistina  $\beta$  lactona 20  $\mu\text{M}$ , sobre el número de quistes producidos *in vitro*. Los inhibidores evaluados no afectaron la eficiencia en enquistación y produjeron un número de quistes muy similar al control (Fig. 28A). Estos resultados son consistentes con el reporte de Stefanic y Colaboradores (2006), quienes evaluaron tres inhibidores del proteosoma (Pefabloc<sup>®</sup>SC (Fluka), 40 y 80  $\mu\text{M}$ ; MG132 (Sigma), 20 y 60  $\mu\text{M}$ ; y Epoxomicina (Sigma), 3 y 8 nM) durante el proceso de enquistación encontrando las mismas eficiencias en la producción de quistes en los parásitos tratados y los controles.

Los quistes producidos en los grupos tratados y los controles tiene características morfológicas iguales (forma, tamaño y refringencia) (Fig. 28B). Sin embargo al evaluar la viabilidad de los quistes producidos bajo el tratamiento con MG132 50  $\mu\text{M}$ , empleando tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA), se evidenció una reducción de más del 50% en este parámetro en los quistes tratados Vs los controles (Fig. 29 y Fig. 30). Estos resultados indican que el sistema ubiquitina proteosoma podría estar involucrado en la regulación, maduración o control funcional del proceso de enquistación. Algunos estudios previos muestran argumentos que apoyarían esta hipótesis, Lopez y Colaboradores (2002) reportaron que la glucosamina 6-fosfato isomerasa, una enzima involucrada en la síntesis de la pared del quiste, es ubiquitinada y degradada dentro de los quistes, sin embargo, se desconoce su mecanismo exacto de degradación. Además, Stefanic y Colaboradores (2006) demostraron que el proteosoma 26S de *G. intestinalis* se asocia con las Vesículas Específicas de Enquistación (ESV) durante la fase temprana de este proceso (7 h post-inducción). La asociación del proteosoma a sistemas de membranas en las células eucariotas ha sido bien caracterizado en el proceso de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (*endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation-ERAD*) (revisión por Meusser et al, 2005) y la ubiquitinación se ha relacionado directamente con el proceso de tráfico selectivo de proteínas a través de sistemas de membranas (*endosomal sorting complex required for transport-ESCRT*) y el proceso de ERAD (revisiones por Raiborg y Stenmark 2009; Hirsch et al, 2009). Con esta información previa y los resultados de este trabajo no se puede destacar que el sistema ubiquitina proteosoma de *G. intestinalis* este participando en la activación y/o degradación

de enzimas de la vía de síntesis de la pared del quiste y muy probablemente esté involucrado también en el procesamiento y control de calidad del cargo de las ESV y en la translocación de productos durante el transporte de las proteínas de la pared del quiste. Son indispensables estudios funcionales y la identificación de blancos de ubiquitinación y degradación durante la enquistación de *Giardia* para comprender la participación del sistema Ubiquitina-Proteosoma en este proceso de diferenciación.

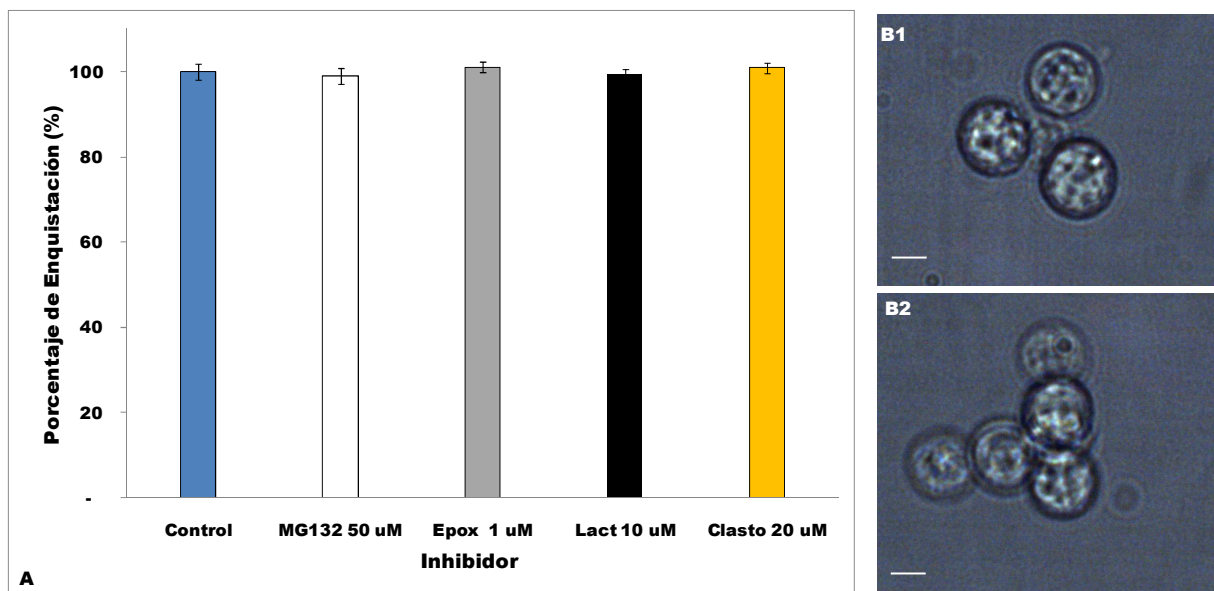


Figura 28. Eficiencia de Enquistación *in vitro* de *G. intestinalis* con Inhibición del Proteosoma. **A.** Se indujo el proceso de enquistación *in vitro* (Kane et al, 1991), en presencia de cuatro inhibidores del proteosoma en las concentraciones señaladas. Los controles fueron adicionados con DMSO. Los resultados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de un experimento representativo con cuatro observaciones por inhibidor. Cada experimento fue repetido. **B.** Microfotografías de microscopia de luz de quistes control (B1) y quistes inhibidos con MG132 50 uM (B2). Magnificación 40X. Se empleó un microscopio Zeiss Axiophot Carl. Barra= 5 micras

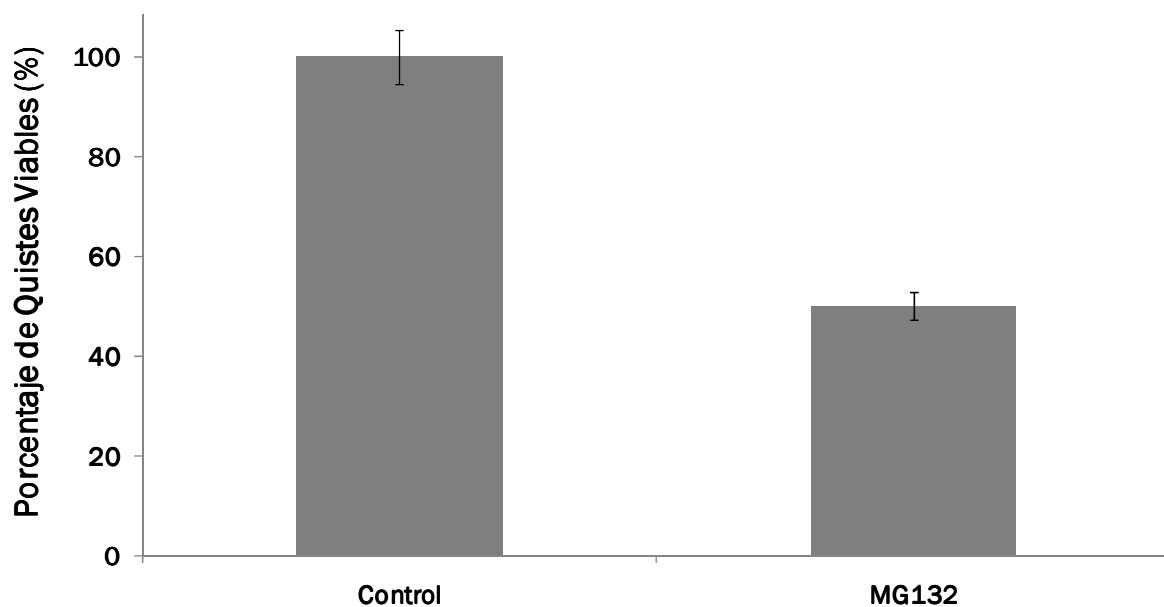


Figura 29. **Efecto de MG132 50 uM sobre la viabilidad de quistes de *G. intestinalis***. La viabilidad de los quistes producidos *in vitro* se determinó por incubación con tinción de Diacetato de Fluoresceina (FDA). Los controles fueron adicionados con DMSO. El porcentaje de quistes viable fue definido como:  $(\text{número de quistes viables} \times 100) / (\text{número total de quistes producidos})$ . Los resultados son promedios representativos de uno de dos experimentos con triplicado  $\pm$  desviación estándar.



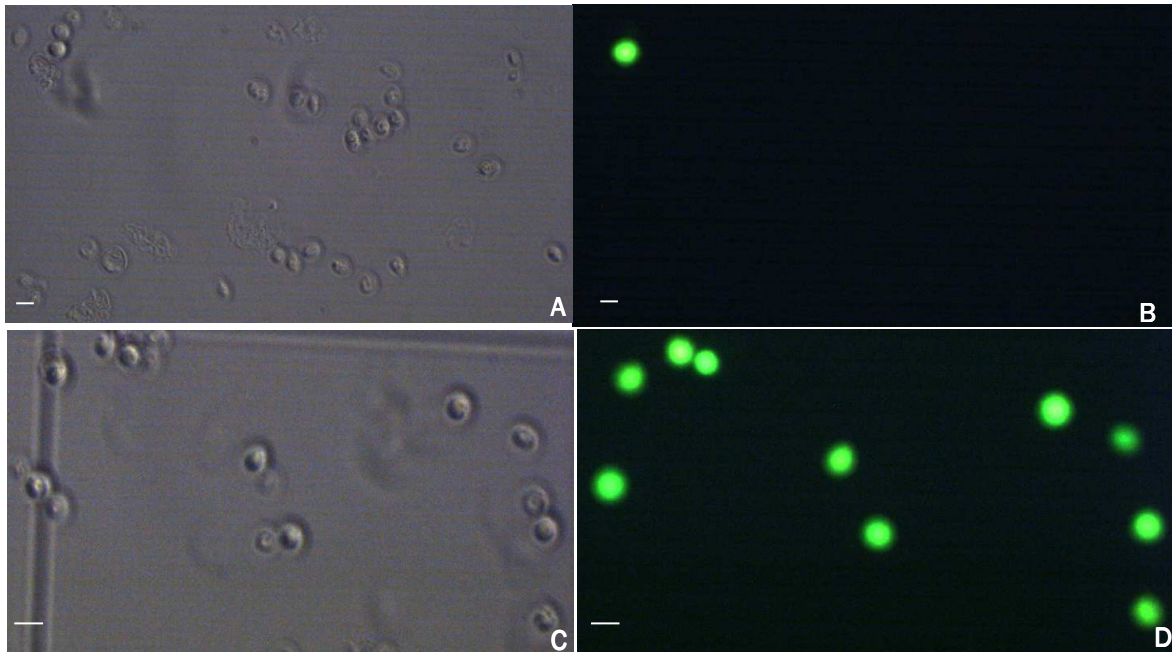


Figura 30. **Ensayo de Viabilidad de Quistes de *G. intestinalis*** . Microfotografías de quistes producidos *in vitro* **A.** Campo con microscopia de luz, quistes producidos bajo tratamiento con MG132 50 uM (magnificación 10X) ; **B.** Campo A con microscopia de fluorescencia. **C.** Campo control tratado con DMSO y observado con microscopia de luz (magnificación 20X) ;**D.** Campo C con microscopia de fluorescencia. Los quistes viables de *G. intestinalis* se observan con fluorescencia verde interna usando un filtro de 450–490 nm<sub>ex</sub>. Se empleó un microscopio Zeiss Axiophot Carl. Barra = 10 micras.

## **6.8. Identificación de una Proteína Ubiquitinada en *G. intestinalis*.**

Gallego y Colaboradores (2007) y Castellanos (2009) han identificado numerosos componentes de la vía de ubiquitinación en *G. intestinalis*. Sin embargo el número de proteínas blanco de este proceso se reduce al reporte de Lopez y Colaboradores (2002), que encontraron que glucosamina 6-fosfato isómerasa es monoubiquitinada. Considerando la importancia de la identificación de proteínas reguladas por ubiquitinación en *Giardia* para entender la biología de este proceso durante el ciclo de vida del parásito se realizaron dos aproximaciones para la identificación de blancos de ubiquitinación en extractos de proteínas y trofozoítos completos. Inicialmente se prepararon experimentos de inmunoafinidad en *batch* con el anticuerpo Anti-UbGi y se evaluó su capacidad de retención y concentración de proteínas ubiquitinadas en extractos de proteína del parásito, previamente enriquecidos con conjugados ubiquitina-proteína mediante el tratamiento con el inhibidor del proteosoma MG132. Sin embargo esta metodología no fue exitosa (datos no mostrados), muy probablemente debido a la gran cantidad de ubiquitina libre endógena presente, la cual puede saturar las perlas e impedir la captura de los conjugados ubiquitina-proteína que se encuentran en menor proporción y son más inestables. Además, pueden influir las condiciones nativas en que se realizan estos ensayos, el anticuerpo Anti-UbGi fue producido contra ubiquitina denaturada y se desconoce su afinidad por la proteína y sus conjugados en forma nativa.

Entonces se abordó una orientación experimental diferente, basados en los ensayos de patrones de ubiquitinación se decidió evaluar la presencia de proteínas que se acumulan luego de la inhibición del proteosoma y que son identificadas específicamente en los ensayos *western blot* por el anticuerpo Anti-UbGi. Con esta metodología y luego de varios ensayos empleando trofozoítos control (adicionados con DMSO) y parásitos tratados con MG132, 50  $\mu$ M; mediante SDS-PAGE en geles Tris-Glicina con T 8%, C 2.6%, para resolver la región de alto peso molecular, se evidenció la aparición consistente de una proteína entre 45 kDa y 66 kDa que se acumulaba y era identificada específicamente por el anticuerpo Anti-UbGi en los parásitos sometidos a inhibición del proteosoma (Fig. 31). Esta banda fue cortada y remitida para su identificación mediante la técnica de MS+MS/MS. Esta proteína fue identificada como: "*Heat shock protein HSP90-alpha (Giardia lamblia ATCC 50803)*" con una masa molecular de 43.752 kDa (Tabla 2). Para corroborar la identidad de esta proteína y validar este resultado se realizaron ensayos de *western blot* empleando los anticuerpos: Anti-HSP90 (monoclonal) y Anti-UbGi sobre trofozoítos completos tratados con DMSO y trofozoítos inhibidos. HSP90  $\alpha$  fue detectada tanto en el control como en el

inhibido, siendo su nivel mayor en los trofozoítos tratados con MG132 50  $\mu$ M, en ambos casos se detecta una proteína de aproximadamente 43 kDa que es el tamaño esperado y algunas bandas más tenues entre 46 y 66 kDa (Fig. 32C). Una de las bandas reconocidas por Anti-HSP90, en este rango de peso molecular, es claramente marcada con el anticuerpo antiubiquitina en los trofozoítos control y los inhibidos (Fig. 32B) y corresponde a una proteína de  $\sim$  52 kDa. Este resultado indica que la proteína identificada mediante espectrometría de masas, efectivamente es HSP90 (43,752 kDa) monoubiquitinada (8,5 kDa), por lo cual se ubica exactamente en 52 kDa. HSP90 es una proteína chaperona citoplasmática involucrada en el replegamiento de proteínas en células expuestas a estrés y en la maduración conformacional de proteínas regulatorias claves. Además de su papel citoprotector, HSP90 es expresada bajo condiciones no estresantes, en donde tiene funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis por regulación del control de calidad del plegamiento de proteínas y la estabilización de numerosas proteínas “clients”, que incluyen varios reguladores de diversas vías de transducción de señales (Wandinger et al, 2008). HSP90 está fuertemente regulada mediante varios mecanismos de control que tienen influencia sobre su actividad e incluyen: cambios conformacionales, presencia de cofactores y modificaciones post-transduccionales como acetilación (Scroggins et al, 2007), S-nitrosilación (Garcia-Cardenas et al, 1998), y fosforilación (Dougherty et al, 1987). A pesar de que en varios sistemas de células eucarióticas se ha identificado HSP90 como una proteína ubiquitinada (Kirkpatrick et al, 2005; Vasilescu et al, 2005; Morales y Perdew 2007; Igawa et al, 2009), aún no se conoce el papel fisiológico de esta modificación. En nuestro modelo experimental la detección de la ubiquitinación preferencialmente en los parásitos tratados con inhibidor del proteosoma, puede indicar dos cosas: 1) Al parecer su nivel de ubiquitinación es muy bajo (Fig. 32B) y solo después de que se induce su acumulación se obtiene un nivel muy evidente y 2) La expresión y/o ubiquitinación de HSP90 en los trofozoítos de *G. intestinalis* se incrementa como resultado de la inhibición del proteosoma. Está bien documentado que el tratamiento de células con inhibidores del proteosoma conduce a la inducción de una respuesta de choque térmico, que genera la expresión de las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*- HSP), incluyendo HSP90, proteínas en respuesta al estrés del retículo endoplásmico y en levaduras, la acumulación del disacárido termo protector, trehalosa (Bush et al, 1997; Lee y Goldberg 1998; Mitsiades et al, 2002). Además, se ha observado que la inhibición conjunta del proteosoma y HSP90 en células humanas genera un incremento en el proceso de ubiquitinación de proteínas sustrato y de forma sinérgica causa la muerte celular (Mimnaugh et al, 2004; Falsone et al, 2007).

Cuando se evaluó la presencia de HSP90 durante el proceso de enquistación, mediante ensayos *western blot* se reconocieron varias bandas entre ~40 kDa y 55 kDa observándose claramente un pico a las 6 h post-inducción (Fig. 33), este resultado está acorde con los resultados de Kim y Colaboradores (2009) quienes encontraron un pico de ARN mensajero para HSP90 a las 6 h después de la inducción del proceso de enquistación. Estos resultados sugieren que *G. intestinalis* está bajo estrés cuando el proceso de enquistación se inicia, lo cual activaría una respuesta celular mediada por chaperonas del tipo HSP90 y HSP70 (Kim et al, 2009).

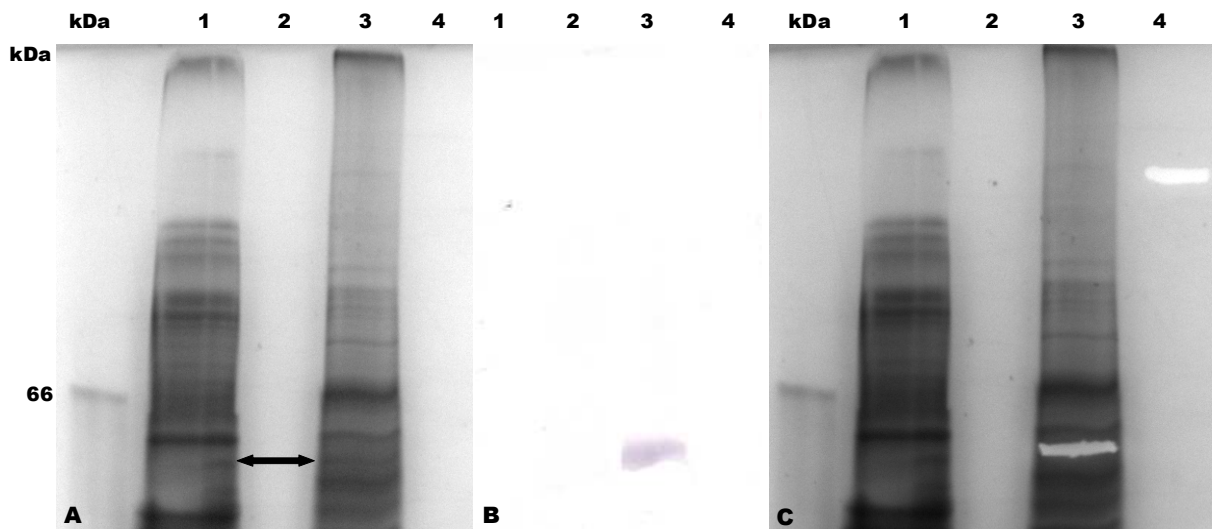


Figura 31. Separación de una proteína blanco de ubiquitinación en *G. intestinalis*. Mediante el uso de un inhibidor del proteosoma se logró la acumulación y separación de una proteína ubiquitinada a partir de trofozoítos. **A.** SDS-PAGE en gel Tris-Glicina 8%T teñido con solución de Coomassie. kDa, patrón de bajo peso molecular para proteínas; 1. 150,000 trofozoítos de *G. intestinalis*; 2. Buffer muestra de electroforesis 1X; 3. 150,000 trofozoítos de *G. intestinalis* tratados por 12 h con MG132 50 uM; 4. Buffer muestra de electroforesis 1X. **B.** Correspondiente *Western blot* del gel A con el anticuerpo Anti-UbGi 1:1000. Se evidencia la detección específica de un conjugado ubiquitina-proteína de aproximadamente 52 kDa, únicamente en los parásitos tratados con MG132. **C.** Corte de la banda de proteína y una banda control negativo del gel Tris-Glicina para su análisis por Espectrometría de Masas. La flecha señala la proteína que se acumula post-inhibición del proteosoma.

Tabla 2. Resultados de Espectrometría de Masas: MS+MS/MS.

Rank	Protein Score	Protein Score C. I. %	Protein Name	Species	Protein MW	Protein PI	Accession No.	Pep. Count	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	101	99.997	Heat shock protein HSP 90-alpha [Giardia lamblia ATCC 50803]	Giardia lamblia ATCC 50803	43752.3	5.51	gi 159115537	9	46	99.067
<b>Peptide Information</b>										
Calc. Mass	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1156.5269	1156.5576	0.0307	27	164	172	DYFGEELQR				Mascot
1347.7015	1347.7139	0.0124	9	260	270	KEVEVHEHVNK				Mascot
1364.6416	1364.6771	0.0355	26	325	335	RAPFDMWDAQK				Mascot
1380.6365	1380.6738	0.0373	27	325	335	RAPFDMWDAQK			Oxidation (M)[6]	Mascot
1551.6849	1551.729	0.0441	28	281	292	DVTEDEYKDFYK				Mascot
1555.8955	1555.9001	0.0046	3	45	58	LHFTSLTRPSVLGK				Mascot
1631.8785	1631.8866	0.0081	5	72	86	DNILVIRDTGVGMTK				Mascot
1826.8014	1826.906	0.1046	57	148	163	WSSTAGGTFEIEECPK			Carbamidomethyl (C)[14]	Mascot
1969.9515	1969.9976	0.0461	23	293	309	QINPSDYEGHLAVSHFR				Mascot
1969.9515	1969.9976	0.0461	23	293	309	QINPSDYEGHLAVSHFR	46	99.067		Mascot
2072.0671	2072.105	0.0379	18	261	277	EVEVHEHVNKQPAWTR				Mascot
2	94	99.988	cytosolic-type hsp90 [Giardia intestinalis]	Giardia intestinalis	40166.4	5.2	gi 57157173	8	46	99.067
<b>Peptide Information</b>										
Calc. Mass	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1156.5269	1156.5576	0.0307	27	164	172	DYFGEELQR				Mascot
1347.7015	1347.7139	0.0124	9	260	270	KEVEVHEHVNK				Mascot
1364.6416	1364.6771	0.0355	26	325	335	RAPFDMWDAQK				Mascot
1380.6365	1380.6738	0.0373	27	325	335	RAPFDMWDAQK			Oxidation (M)[6]	Mascot
1551.6849	1551.729	0.0441	28	281	292	DVTEDEYKDFYK				Mascot
1555.8955	1555.9001	0.0046	3	45	58	LHFTSLTRPSVLGK				Mascot
1631.8785	1631.8866	0.0081	5	72	86	DNILVIRDTGVGMTK				Mascot
1969.9515	1969.9976	0.0461	23	293	309	QINPSDYEGHLAVSHFR				Mascot
1969.9515	1969.9976	0.0461	23	293	309	QINPSDYEGHLAVSHFR	46	99.067		Mascot

Laboratorio que proceso las muestras: Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Cordoba (España).

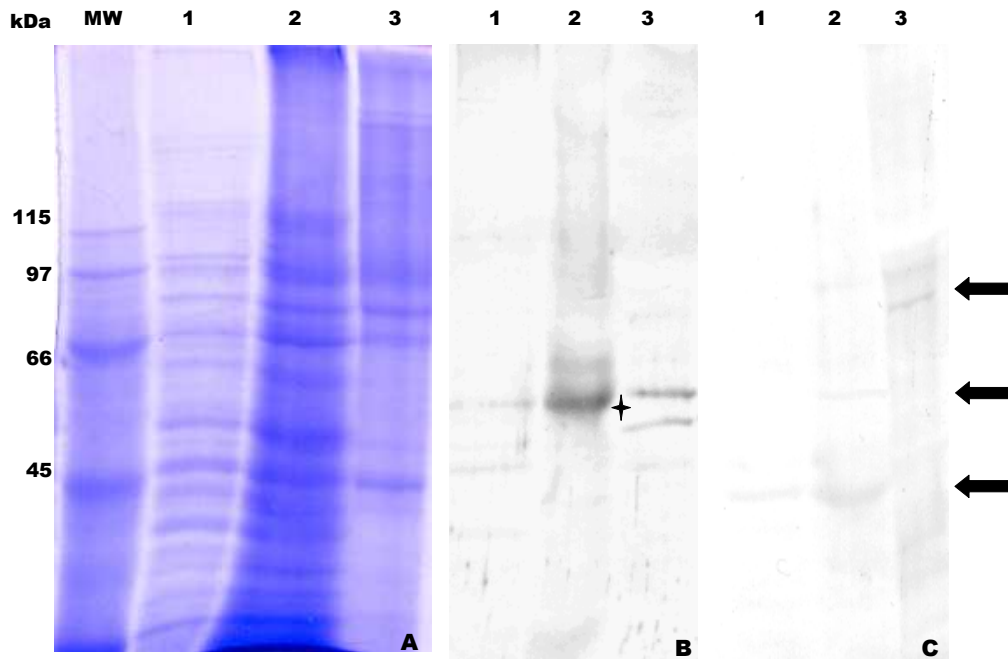


Figura 32. Ubiquitinación de HSP90 en *Giardia intestinalis*. **A.** SDS-PAGE en gel Tris-Glicina T:8% teñido con Coomassie La concentración de parásitos se ajustó a 200,000 células por pozo. kDa, MW, Patrón de alto peso molecular para proteínas; 1. Trofozoítos de *G. intestinalis* tratados por 12 h con DMSO; 2. Trofozoítos de *G. intestinalis* tratados por 12 h con 50  $\mu$ M de MG132; 3. Trofozoítos de *Plasmodium falciparum*. **B.** Ensayo western blot de la electroforesis A con anticuerpo Anti-UbGi en dilución 1:1000. **C.** Ensayo western blot de la electroforesis A con anticuerpo monoclonal Anti-HSP90 en dilución 1:300. Las flechas indican la detección de HSP90. La estrella señala HSP90 monoubiquitinada.

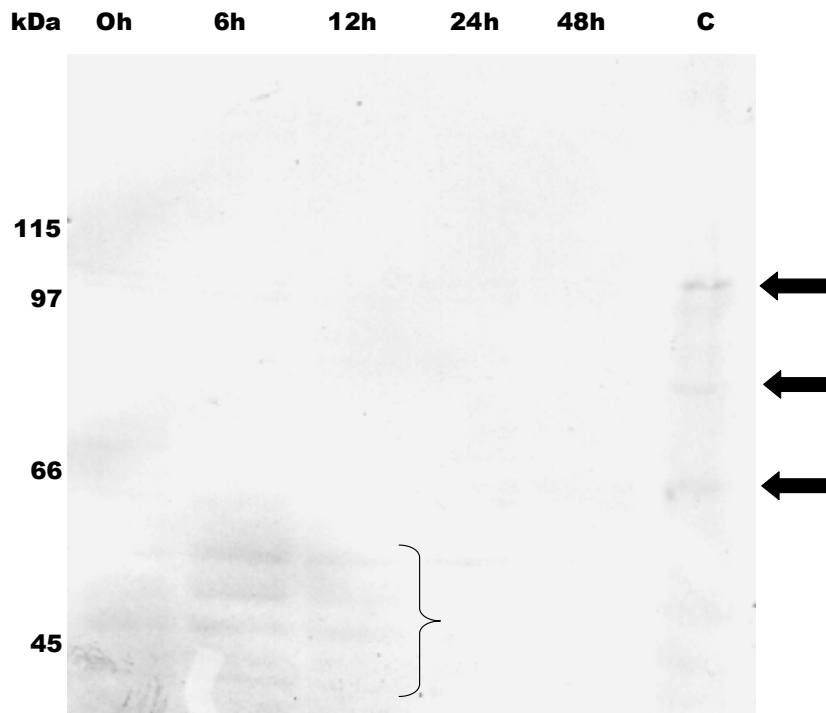


Figura 33. **Expresión de HSP90 durante la Enquistación de *Giardia intestinalis*.** Western blot de un gel de SDS-PAGE Tris-Glicina T:7% con extracto de proteínas de trofozoítos inducidos a enquistar. La concentración de proteína por punto fue ajustada a 10 ug/pozo. **kDa**, marcador de alto peso molecular para proteínas. 0h, 6h, 12h, 24h y 48h luego de la adición del medio de enquistación. **C**, control con 100,000 trofozoítos de *Plasmodium falciparum*. Se empleó el anticuerpo monoclonal anti-HSP90 en una dilución 1:300. Las flechas señalan HSP90 en *P. falciparum*. El corchete indica las bandas reconocidas por el anticuerpo Anti-HSP90 en los extractos proteicos del proceso de enquistación.

## **6.9. Actividad del Proteosoma en Extractos Crudos de Proteína del Estadio de Trofozoíto.**

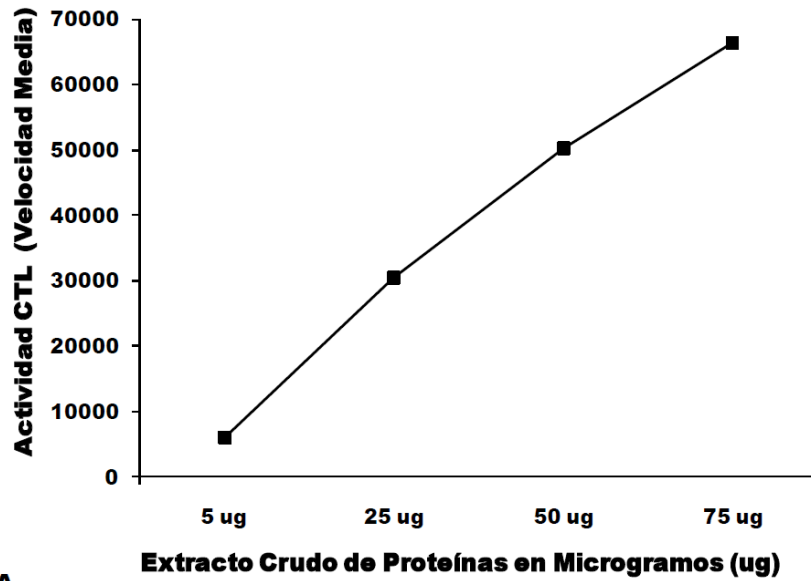
Para estudiar la actividad peptidasa del proteosoma de *G. intestinalis*, extractos proteicos de trofozoítos fueron evaluados usando los sustratos Suc-LLVY-AMC y Z-LLE-AMC. Se detectó actividad similar al proteosoma en todos los extractos analizados y esta se incrementó linealmente al incrementar la cantidad de proteína (Fig. 34). Para efectos de comparar la actividad similar a quimotripsina (CTL) y la actividad similar a caspasa (CL) se realizaron experimentos con una concentración normalizada de proteína (20 µg) y se observó de forma consistente que la tasa de hidrólisis fue más alta con el sustrato Z-LLE-AMC (Fig. 35). Nuestros resultados muestran por primera vez, que en los extractos completos de proteína de *G. intestinalis* están presentes las actividades hidrolíticas CTL y CL, que son características del proteosoma. Sin embargo debe considerarse que esta actividad corresponde a la actividad presente en un extracto crudo completo en el cual no se descarta la participación de otras actividades peptidasa capaces de degradar estos péptidos fluorogénicos en alguna medida (Rodgers y Dean 2003).

Para conocer la actividad peptidasa específica del proteosoma de *Giardia* se realizó el fraccionamiento de los extractos proteicos empleando centrifugación en gradientes de densidad empleando un gradiente lineal de glicerol del 10 al 40%. Mediante este ensayo fue posible determinar la presencia de dos picos de actividad enzimática con ambos sustratos fluorogénicos (Fig. 36). El primer pico corresponde a una actividad peptidasa similar al proteosoma que no es inhibida por epoxomicina y el segundo pico corresponde a la actividad proteosomal específica, ya que migra junto con las fracciones 20S del proteosoma bovino empleado como control y su actividad peptidasa es específicamente inhibida por epoxomicina. La actividad peptidasa frente a los péptidos fluorogénicos siempre fue mayor en el pico temprano (Fig. 36), y en ambos picos se conservó un patrón de mayor actividad hacia el sustrato Z-LLE-AMC frente a la actividad hacia el sustrato Suc-LLVY-AMC (Datos no mostrados). Indicando entonces que el proteosoma de *G. intestinalis* tiene una mayor actividad CL y una baja actividad CTL.

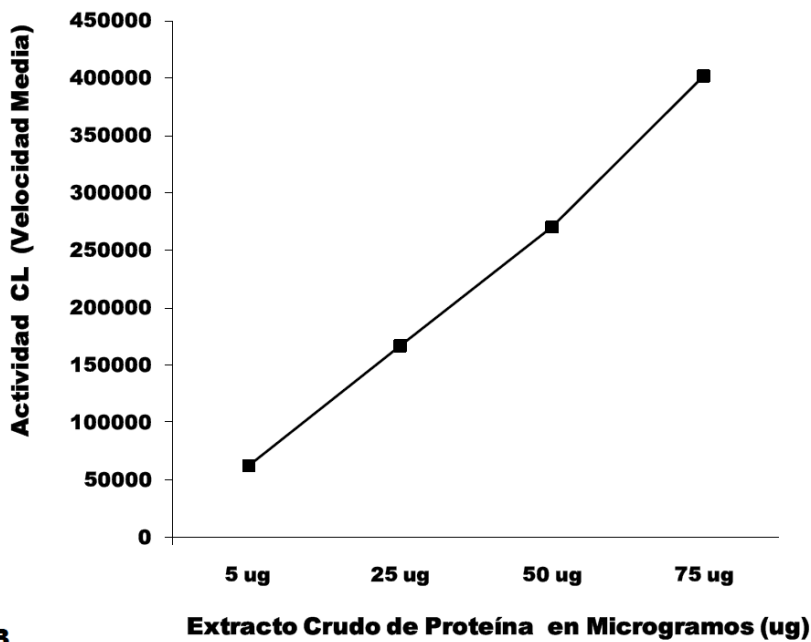
La especificidad por sustrato del proteosoma de *G. intestinalis* difiere de la descrita para los proteosomas de mamíferos, de algunos protozoarios como *Leishmania mexicana* (Robertson et al, 1999), el actinomiceto *Rhodococcus sp.* (Tamura et al, 1995) y de algunos Archaea como *Thermoplasma acidophilum* (Akopian et al, 1997), en los cuales siempre predomina la actividad



CTL. Algunos proteosomas de parásitos protozoarios también tienen características de especificidad por los sustratos fluorogénicos diferentes, por ejemplo *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma brucei* han mostrado una mayor actividad similar a tripsina (TL) (Silva-Jardim et al, 2004; Hua et al 1996). Se ha demostrado ampliamente que proteosomas de diferentes orígenes pueden tener una actividad peptidasa diferente sobre una misma proteína, probablemente debido a las diferencias en especificidad y nivel de actividad de sus subunidades catalíticas (Hua et al, 1995; Leibovitz et al, 1995). Además, debe considerarse que la actividad peptidasa del proteosoma, también se ve influenciada por su estado de activación, mostrando diferentes niveles de actividad dependiendo de la forma del proteosoma que prevalece: partícula central 20S, latente o activa, y/o proteosoma 26S (Ma et al, 1992; Toes et al, 2001). La actividad peptidasa observada frente a los péptidos fluorogénicos ensayados en los extractos crudos de proteína de *G. intestinalis* tiene un patrón de actividad peptidasa muy similar al observado en el proteosoma del Methanoarchaeon, *Methanosarcina thermophila* (Maupin-Furlow, Aldrich and Ferry 1998) y al del proteosoma del parásito protozoario *Entamoeba invadens* (Gonzalez et al, 1999), en los cuales la actividad CTL es muy inferior a la actividad CL. Con lo cual podemos concluir que la fracción proteosomal del extracto proteico de *G. intestinalis* hidroliza preferencialmente enlaces peptídicos después de residuos de aminoácidos ácidos (actividad similar a caspasa). En el futuro sería interesante evaluar si esta característica tiene relación con el tipo de sustratos que son degradados por el proteosoma en este protozoario tempranamente divergente.



**A**



**B**

Figura 34. Titulación de la Actividad Peptidasa en Extracto Crudo de Proteínas de Trofozoítos de *G. intestinalis*. Se realizaron ensayos para evaluar la presencia de actividad peptidasa proteosomal en extracto crudo de proteínas empleando dos sustratos fluorogénicos. **A**. Ensayo con Suc-LLVY-AMC, para evaluar actividad similar a quimotripsina (CTL). **B** Ensayo con Z-LLE-AMC para evaluar la actividad similar a caspase (CL). Las figuras muestran que la actividad peptidasa del extracto se incrementa de forma lineal a medida que se aumenta la concentración de proteína. Los datos corresponden a un experimento representativo con duplicados por cada punto analizado. Este tipo de evaluación se realizó a cada extracto producido y siempre fue repetido.

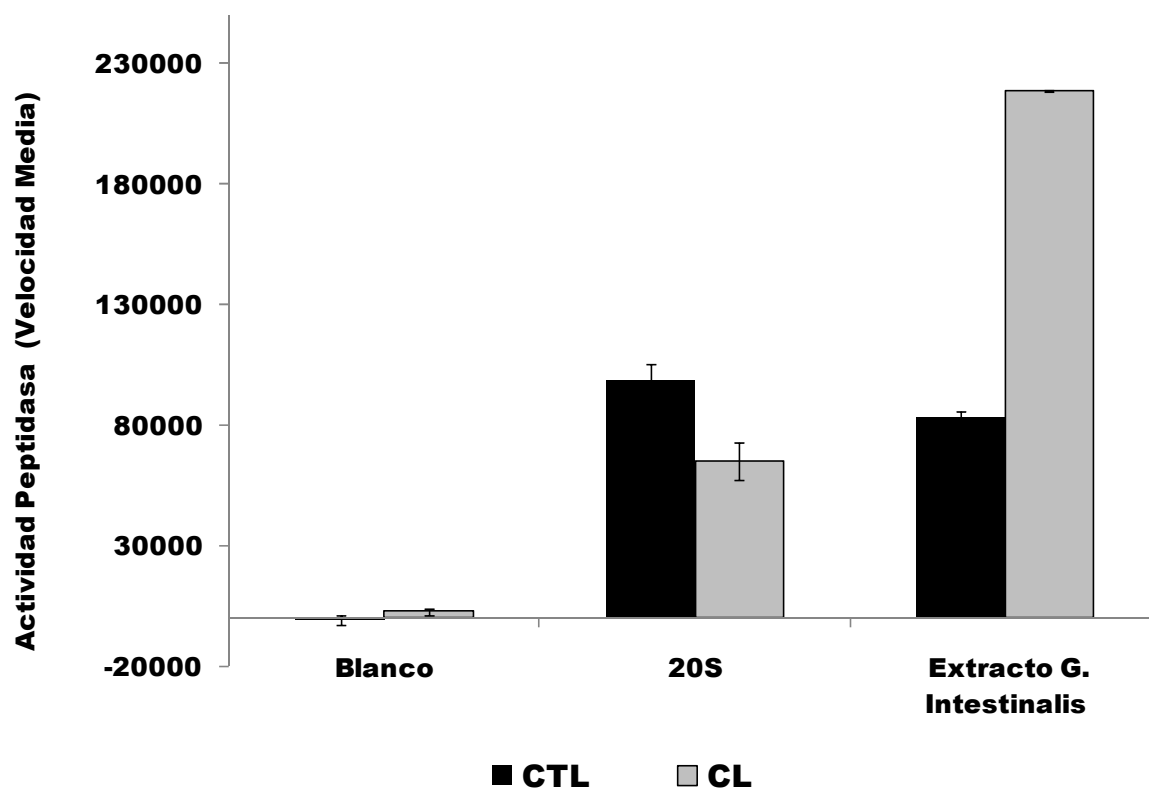


Figura 35. **Actividad Peptidasa similar al Proteosoma en Extractos Crudos de *G. intestinalis***. Para estudiar la actividad peptidasa del proteosoma, extractos proteicos completos de trofozoítos fueron evaluados usando los sustratos: Suc-LLVY-AMC y Z-LLE-AMC, para evaluar las actividades peptidasa similar a quimotripsina (CTL) y similar a Caspasa (CL) respectivamente. La concentración de proteína fue normalizada a 20 ug en todos los experimentos. Los resultados son el promedio  $\pm$  SD de tres experimentos realizados en condiciones similares cada uno con duplicado.

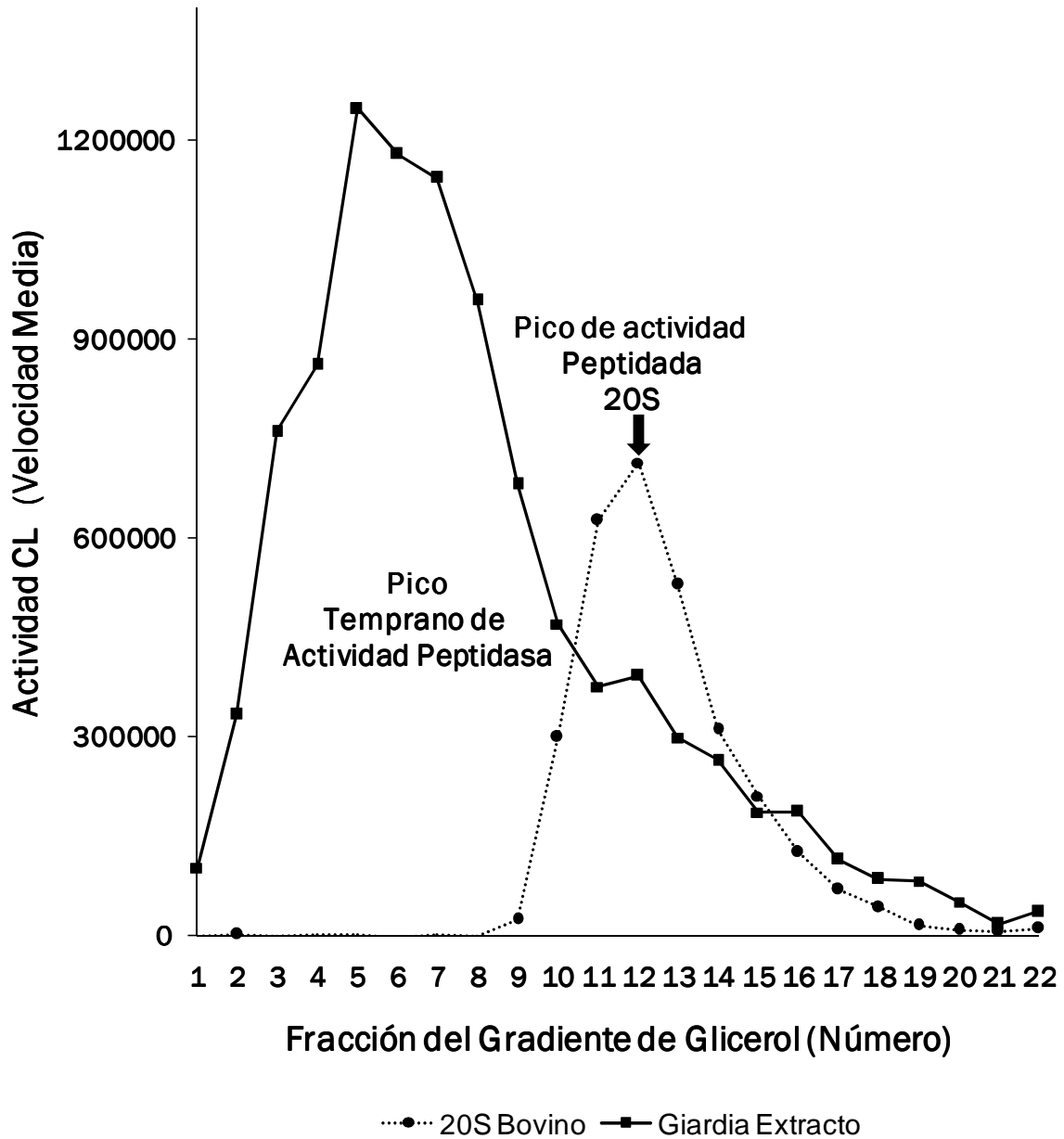


Figura 36. Perfil de Actividad Peptidasa Similar a Caspasa de un Extracto Crudo de Trofozoítos de *G. intestinalis*. Los ensayos enzimáticos se realizaron con el sustrato Z-LLE-AMC sobre extractos de proteína fraccionados por centrifugación en gradientes lineales de densidad (Glicerol de 10–40%). Como control se incluyó proteosoma 20S bovino. Los extractos de *G. intestinalis* tiene dos picos de actividad peptidasa. El primer pico corresponde a una peptidasa aún no caracterizada con actividad enzimática similar al proteosoma y el segundo pico corresponde al proteosoma 20S de *G. intestinalis*. La gráfica muestra un experimento representativo de al menos dos realizados por cada extracto producido, cada uno con duplicado.

## **6.10. Actividad del Proteosoma en Extractos Crudos de Proteína Durante el Proceso de Enquistación.**

Se determinó la tasa de hidrólisis de péptidos fluorogénicos en extractos crudos de proteína obtenidos en diferentes tiempos durante la enquistación de *G. intestinalis* (Fig. 37). Se observó un incremento significativo en la actividad de hidrólisis durante las 48 h del proceso de enquistación así: 1.5-veces a las 6 h, 2.8-veces a las 12 h y 6.7-veces a las 24 h. Para evaluar la actividad específica del proteosoma, muestras de extracto de proteína de 0 h (antes del estímulo) y 24 h del proceso de enquistación, fueron fraccionadas y analizadas mediante centrifugación en gradientes de densidad preparados con glicerol. La figura 38 muestra que la actividad CTL está presente en ambas muestras y además está dividida en dos picos: el pico temprano, correspondiente a una peptidasa no inhibida por epoxomicina y la actividad del proteosoma 20S, específicamente inhibido por epoxomicina y que coincide con el pico de actividad del control. La mayor parte de la actividad peptidasa observada en los extractos crudos de proteína corresponde al pico temprano y su actividad es incrementada 11.5-veces a las 24 h del proceso de enquistación. De igual manera hay un incremento de 5-veces en la actividad específica del proteosoma a las 24 h de este proceso de diferenciación. Los resultados de actividad enzimática fueron muy similares para el sustrato Z-LLE-AMC (datos no mostrados), conservando el patrón observado en los extractos de trofozoítos, así los extractos proteicos del proceso de enquistación mostraron mayor actividad CL que actividad CTL (datos no mostrados). Estos resultados muestran que el proteosoma de *G. intestinalis* incrementa sus actividades enzimáticas CTL y CL durante el proceso de enquistación, este incremento va acompañado de un aumento muy notorio de otra actividad peptidasa no proteosomal. Las razones de este incremento podrían explicarse por: 1) Incremento en el número de proteosomas durante la enquistación. Se han descrito diferencias dramáticas en el contenido de proteosomas de diferentes poblaciones celulares durante el desarrollo de varias células eucariotas. Estas diferencias presumiblemente se ven reflejadas en grandes diferencias en las tasas de proteólisis durante el desarrollo celular (Klein et al, 1990; Dawson et al, 1995; Jones et al, 1995). Sería esencial iniciar estudios que determinen cambios en los niveles de los ARNm de las diferentes subunidades del proteosoma de *G. intestinalis* para corroborar o descartar esta posibilidad. 2) Incremento en la actividad peptidasa de las subunidades catalíticas del proteosoma en respuesta a estímulos propios del proceso de enquistación. En células eucariotas superiores está muy bien documentada la inducción de síntesis de subunidades proteosomales catalíticas con mayor eficiencia en la degradación de sustratos específicos, en respuesta a diferentes

estímulos; el caso mejor descrito, es la generación de inmunoproteosomas durante la respuesta a infecciones bacterianas o virales (Tanaka 2009). En este aspecto será de gran interés la caracterización bioquímica de cada una de las subunidades proteosomales de este protozooario y 3) Activación del proteosoma por su asociación a un activador específico como la partícula reguladora 19S (PA700). En el genoma de *G. intestinalis* se han identificado varias subunidades de PA700 (Emmerlich et al, 2001; Castellanos 2009), pero se desconocen las características de actividad proteasa del 26S durante el ciclo de vida de este protozooario.

La información obtenida con esta aproximación experimental indica que los procesos de degradación específica de proteínas son aparentemente activados durante la enquistación de *G. intestinalis*. Kim y colaboradores (2009) reportan que existen cambios dramáticos en la expresión de proteínas durante la enquistación de este parásito. Además se ha descrito la expresión diferencial de varios genes durante este proceso (Mowatt et al 1995; Lujan et al 1996; Que et al 1996; Knodler et al. 1999) y los cambios morfológicos y metabólicos que demanda la transformación de trofozoíto a quiste requieren de síntesis y degradación de proteínas unas porque deben estar disponibles y funcionales y otras porque dejarán de funcionar y deben silenciarse. Sin embargo, no se conocen las vías de degradación específica de proteínas, los sustratos involucrados y su regulación durante este importante proceso de diferenciación. Este trabajo constituye el primer reporte que de forma preliminar caracteriza los niveles de actividad peptidasa (CTL y CL) específica del proteosoma durante la enquistación y que además reporta la presencia de una actividad similar al proteosoma que se incrementa de forma importante durante las primeras 24 h de la enquistación, por lo que en junto con el proteosoma, podrían desempeñar un papel crucial en el desarrollo de este proceso.

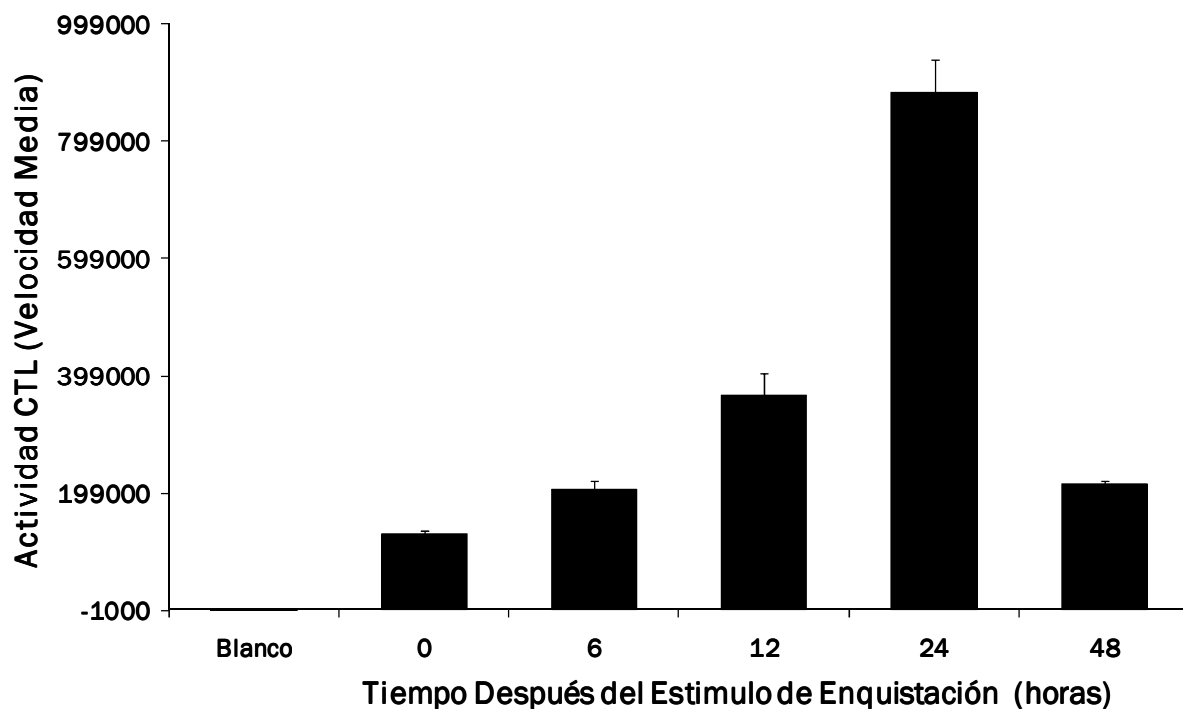


Figura 37. **Actividad Peptidasa CTL Durante la Enquistación de *G. intestinalis*.** Tasa de hidrolisis del péptido fluorogénico Suc-LLVY-AMC en extractos de proteínas obtenidos durante diferentes tiempos del proceso de enquistación. La concentración de proteína fue normalizada en cada punto a 20 ug. La gráfica corresponde a un experimento representativo con triplicado por cada punto.

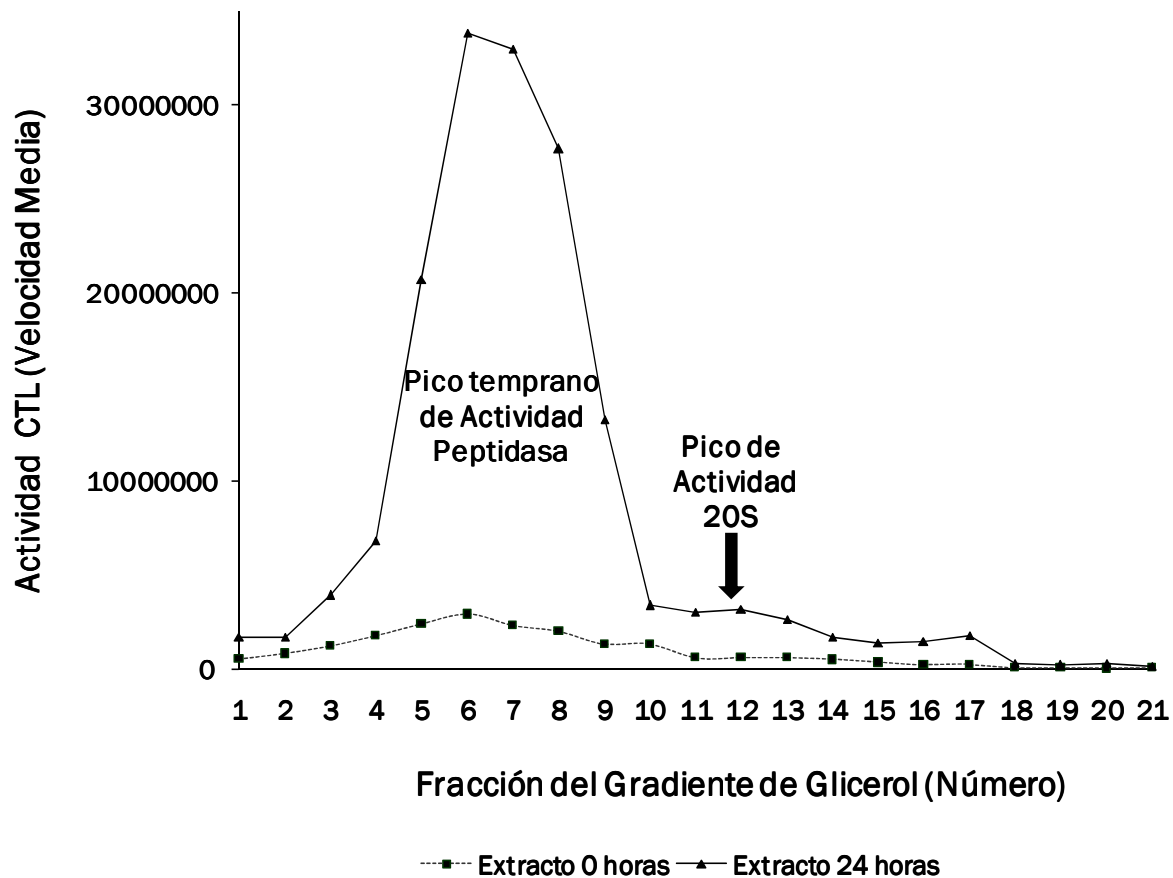


Figura 38. Fraccionamiento de Actividad Peptidasa de Extractos de Proteína del Proceso de Enquistación de *G. intestinalis*. Muestras de extractos de proteína de 0 h (antes del estímulo) y 24 h del proceso de enquistación fueron fraccionados por centrifugación en gradientes lineales de densidad preparados con glicerol del 10–40%. La actividad peptidasa fue evaluada para cada fracción con el sustrato Suc-LLVY-AMC. Se observan dos picos de actividad, uno corresponde a una peptidasa aun no caracterizada (pico temprano) y el pico de actividad proteosomal 20S. La gráfica muestra los resultados de un experimento representativo con duplicado. Cada experimento fue realizado mínimo dos veces.



### **6.11. Ensayos de Actividad Enzimática en Gel (Overlay Assay).**

Para iniciar la caracterización de las actividades peptidasa presentes en los extractos de proteínas de *G. intestinalis*, se seleccionaron fracciones representativas de los dos picos de actividad observados luego del fraccionamiento de los extractos en los gradientes de glicerol y se evaluaron mediante ensayos de actividad enzimática con el sustrato Z-LLE-AMC sobre geles analizados en PAGE no denaturante. En cada ensayo se incluyó proteosoma 20S de bovino como control (Fig. 39A y 39C). Se detectó una región de actividad enzimática de aproximadamente 10S en las fracciones del primer pico (pico temprano) (Fig. 39B). Con las fracciones del segundo pico (el cual previamente fue confirmado como 20S) no fue posible observar actividad peptidasa (Fig. 39D), probablemente debido a la menor sensibilidad de este método frente a los ensayos en placa. Estos resultados confirman la presencia de actividad enzimática similar al proteosoma en la región 10S, lo cual indica que se trata de una enzima de la mitad del tamaño del proteosoma y al igual que este podría estar conformada por varias subunidades. Con esta información experimental, los resultados de inhibición del proteosoma en cultivo y teniendo en cuenta los artículos científicos que reportan, la purificación de una enzima del tipo tripeptidil peptidasa en *Entamoeba histolytica*, con características de fraccionamiento en gradientes de densidad muy similares al nuestro (Flockenhaus et al. 2000) y un incremento en la expresión y actividad de la enzima tripeptidil peptidasa (TPP) II, como un mecanismo compensatorio a la inhibición del proteosoma (Geier et al, 1999; Wang et al 2000; Naujokat et al, 2007), decidimos emplear el sustrato fluorogénico, AAF-AMC, para evaluar la actividad tripeptidil peptidasa en extractos de proteína completos y en las fracciones del pico temprano de *G. intestinalis*. Este sustrato es considerado altamente específico para esta enzima (Geier et al 1999). Los resultados de los ensayos de actividad en gel mostraron que tanto los extractos de proteína completos (datos no mostrados) como las fracciones del pico temprano son activas contra este sustrato en un *buffer* de pH 9.0 y la actividad se ubica en la región 10S (Fig. 39E), coincidiendo exactamente con la actividad similar al proteosoma. Además, esta actividad peptidasa fue específicamente inhibida por el inhibidor de aminopeptidasas del tipo serina, H-Ala-Ala-Phe-CH<sub>2</sub>Cl 50  $\mu$ M y MG132 50  $\mu$ M y no fue afectado por epoxomicina, 1  $\mu$ M (Fig. 40). Estos datos sugieren que esta enzima podría ser una tripeptidil peptidasa II (TPP II), la cual es citoplasmática y coopera con el proteosoma y con dipeptidasas en la degradación de sustratos (Thomkinson and Lindås 2005). Sin embargo y sin la purificación y caracterización profunda de esta peptidasa no es posible descartar que se trate de otra enzima. Hay varios reportes de la presencia de peptidasas con actividad similar al proteosoma en células eucariotas.

Vigouorux y Colaboradores (2003) encontraron una actividad peptidasa con características similares a la actividad proteosomal en extractos de proteínas de células humanas, la principal diferencia con nuestros resultados es que esta aminopeptidasa carece de actividad similar a caspasa. Por otro lado, estudios previos han encontrado genes homólogos para las peptidasas HslV (*homologous to eubacterial heat shock locus v-HslV*) y HslU (*heat shock locus u -HslU*) en el genoma de varios protistos y han demostrado su expresión en conjunto con el proteosoma (Couvreur et al 2002; Gille et al. 2003). Algunos investigadores han especulado con respecto a su presencia como sistemas redundantes y complementarios al proteosoma (Ruíz-González y Marín 2006). Recientemente, Mordmüller y colaboradores (2006) reportaron que *P. falciparum* expresa dos complejos treonina-peptidasa durante su ciclo de vida asexual. Considerando los resultados previos y nuestros hallazgos, es muy probable que también *G. intestinalis* tenga peptidasas adicionales con una función redundante a la del proteosoma y posiblemente la peptidasa 10S, que nosotros identificamos sea el primer ejemplo de esta situación en este protozoario.

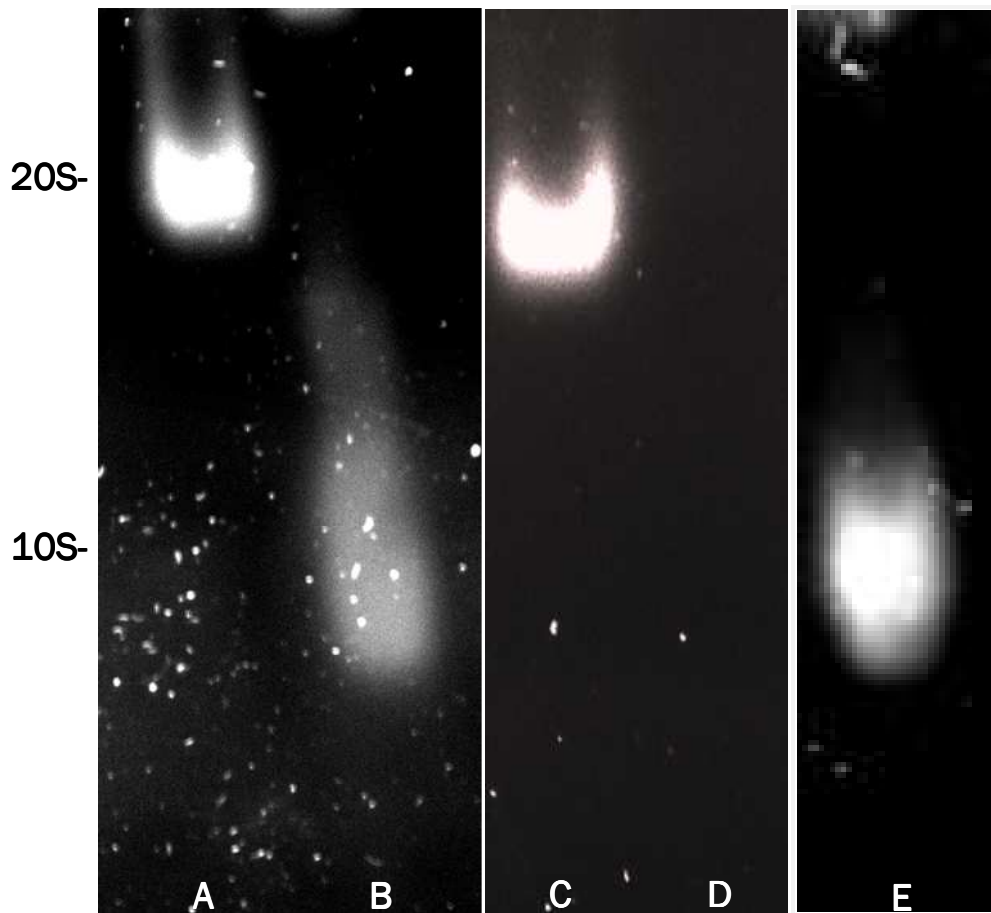


Figura 39. **Ensayo de Actividad Peptidasa en Gel Nativo (Overlay assay).** Extractos crudos de proteína de *G. intestinalis* fueron fraccionados por centrifugación en gradientes de densidad como se describió previamente. Muestras con 50 mg de proteína de fracciones seleccionadas por su actividad enzimática fueron sometidas a electroforesis sobre geles nativos de poliacrilamida del 4% y evaluados por *overlay assay* con los sustratos Z-LLE-AMC (A–D) y AAF-AMC (E). **A y C.** Proteosoma bovino 20S (5 mg), usado como control; **B,** Fracciones de 15–17.5% (corresponden al pico temprano de actividad); **D.** Fracciones de 30–35% (corresponden al 20S de *G. intestinalis*); **E.** Fracciones de 15–17.5% (corresponden al pico temprano de actividad con el sustrato para actividad tripeptidil peptidasa).

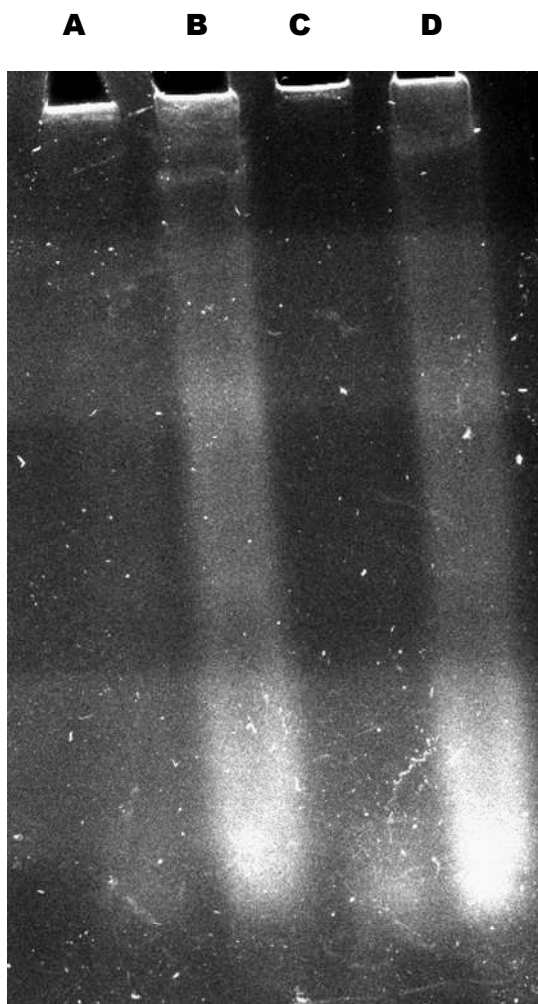


Figura 40. **Ensayo de Inhibición de Actividad Tripeptidil Peptidasa en Gel Nativo (Overlay assay).** Muestras de 20 mg de extracto crudo de proteína de *G. intestinalis* fueron sometidas a electroforesis sobre geles nativos de poliacrilamida del 4% y evaluados por *overlay assay* con el sustrato AAF-AMC, previa incubación por 30 minutos a 37 °C con diferentes inhibidores así: **A.** MG132, 50 uM; **B.** Epoxomicina, 1 uM; **C.** H-Ala-Ala-Phe-CH<sub>2</sub>Cl, 50 uM y **D.** Control con DMSO.

## **6.12. Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa in Vivo**

Luego de observar la presencia de un complejo enzimático de la mitad del tamaño del proteosoma en los extractos de proteína de *G. intestinalis* y que presenta actividad peptidasa hacia los péptidos Suc-LLVY-AMC y Z-LLE-AMC, considerados de alta especificidad para la actividad del proteosoma (Kisselev & Goldberg 2005) y que además es activo frente al sustrato AAF-AMC, considerado específico para actividad tripeptidilpeptidasa. Se realizó la evaluación del efecto de la inhibición de la actividad tripeptidil peptidasa en el estadio de trofozoíto y durante el proceso de enquistación, empleando el potente inhibidor de TPP II, H-Ala-Ala-Phe-CH<sub>2</sub>Cl (AAFCMK). Inicialmente, se analizó el efecto de tres concentraciones del inhibidor sobre el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis* y se observó una reducción en el número de trofozoítos comparado con el control. Este efecto inhibitorio fue evidente con concentraciones de AAFCMK superiores a 20  $\mu$ M y el efecto se observa a partir de las 24 h post-tratamiento (Fig. 41). La reducción en el crecimiento de los trofozoítos fue del orden del 12 % y 20% con concentraciones del inhibidor de 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M respectivamente. La disminución en el número de trofozoítos fue resultado de la reducción en el número de duplicaciones (Fig. 42), las cuales cayeron a la mitad con 50  $\mu$ M de AAFCMK. Con estos resultados podemos sugerir que el efecto de este inhibidor, al igual que los inhibidores del proteosoma, es resultado de un incremento en el tiempo de duplicación celular más que a un aumento de la mortalidad celular, ya que no se observaron alteraciones morfológicas o evidencia de incremento en la mortalidad parasitaria durante estos experimentos.

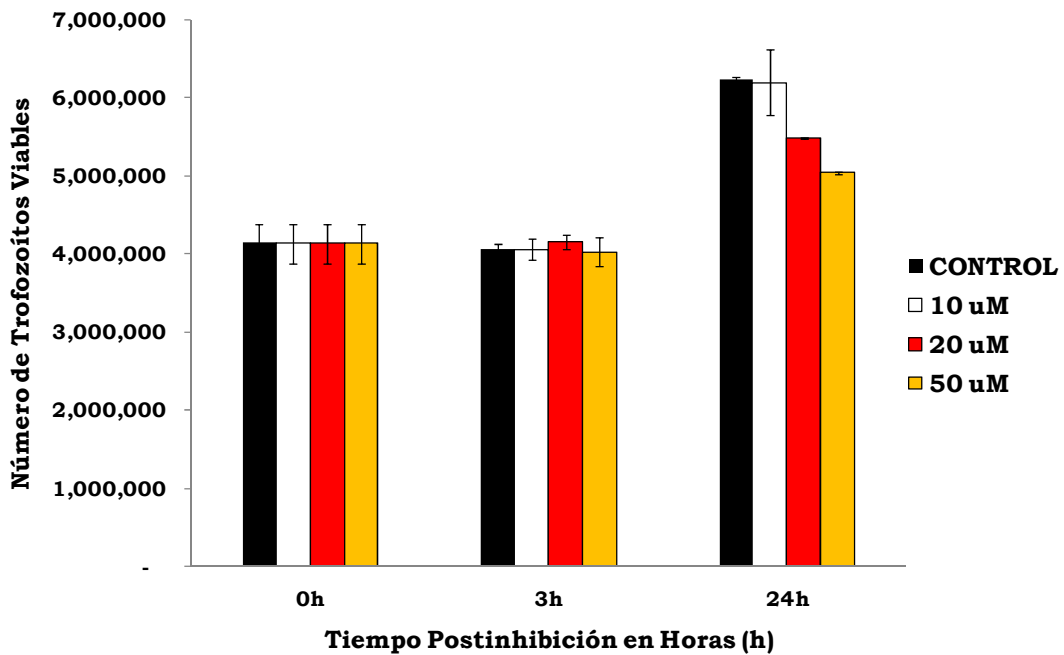


Figura 41. Efecto del Inhibidor de Tripeptidil Peptidasa, H-Ala-Ala-Phe-CH<sub>2</sub>Cl, (AAFCKM) sobre el crecimiento de *G. intestinalis*. Los parásitos fueron incubados por 24 h con cada una de las concentraciones señaladas, en cada experimento se incluyeron controles negativos adicionados con DMSO. Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se repitió al menos dos veces.

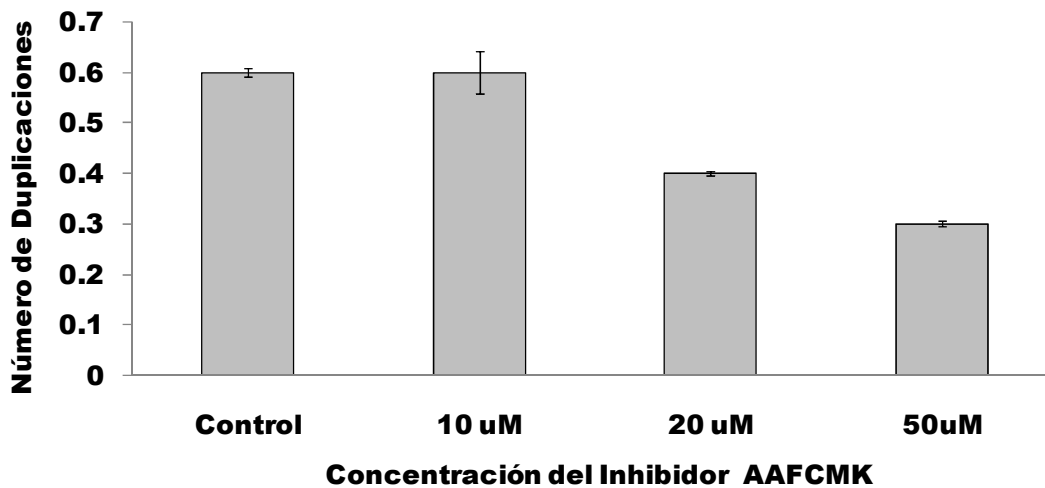


Figura 42. Efecto de la Inhibición de TPP II Sobre el Número de Duplicaciones de los Trofozoitos de *G. intestinalis*. Los parásitos fueron incubados por 24 h con diferentes concentraciones de H-Ala-Ala-Phe-CH<sub>2</sub>Cl (AAFCKM), en cada experimento se incluyeron controles negativos adicionados con DMSO. La gráfica muestra los resultados de Número de Duplicaciones calculadas con la siguiente fórmula:  $\text{Log} [\text{Número de células en el tiempo final} / \text{Número de células en el tiempo inicial}] / \text{Log } 2$ . Los datos son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento se realizó mínimo dos veces.

Cuando se evaluó el efecto del inhibidor AAFCKM, 50  $\mu$ M sobre el proceso de enquistación se observó una reducción del 90% en la eficiencia de enquistación en los parásitos tratados comparado con los controles (Fig. 43). Este efecto marcado sobre el proceso de enquistación, junto con los datos previos de incremento de la actividad de este complejo enzimático (Fig. 38), nos permite sugerir que la actividad de la enzima 10S de *G. intestinalis*, que identificamos en este trabajo, desempeña un papel importante y muy probablemente esencial durante el proceso de enquistación. Estos resultados son el punto de partida para direccionar la investigación y caracterización profunda de los procesos de degradación específica de proteínas durante el ciclo de vida de *G. intestinalis*.

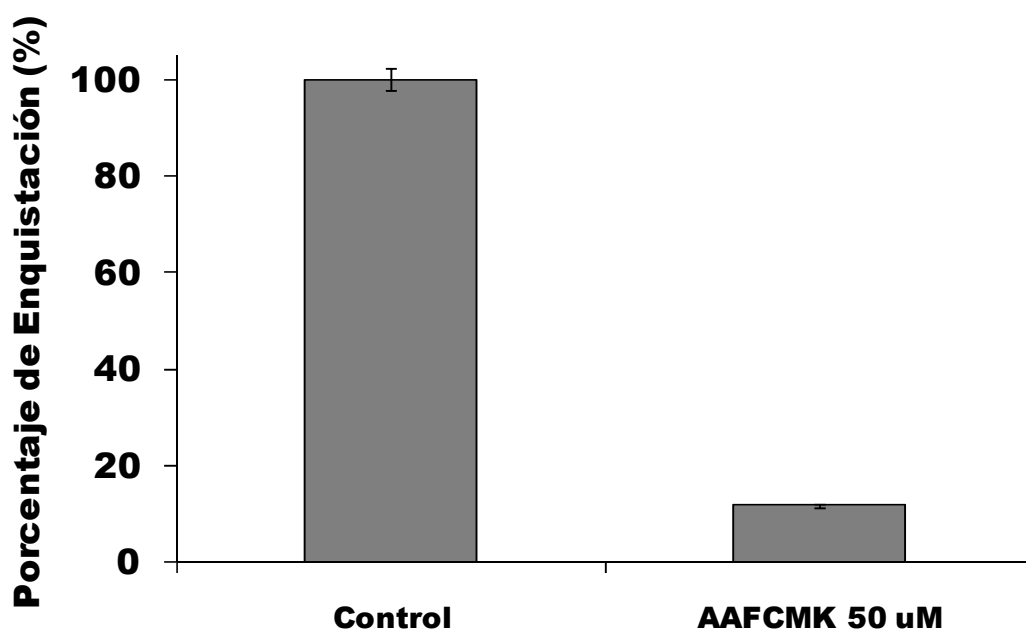
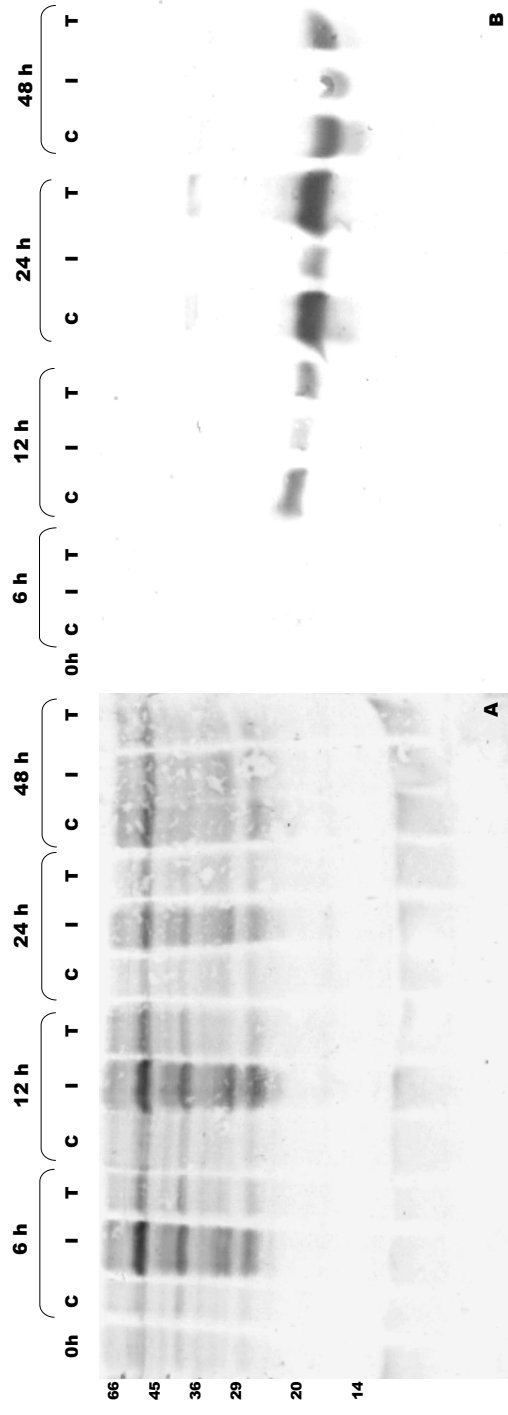


Figura 43. Efecto de la Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa en la Enquistación de *G. intestinalis*. Se indujo el proceso de enquistación *in vitro* (Kane et al, 1991), en presencia del inhibidor H-Ala-Ala-Phe-CHCl, 50  $\mu$ M. Los controles fueron adicionados con DMSO. Los resultados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de un experimento representativo. Cada experimento fue realizado mínimo dos veces.

Luego de evaluar el efecto del inhibidor AAFCMK 50  $\mu$ M sobre los patrones de ubiquitinación durante el proceso de enquistación, se encontró que hay un leve incremento en la acumulación de proteínas de alto peso molecular identificadas por el anticuerpo Anti-UbGi, cuando se compara con los controles. Sin embargo el efecto no fue tan marcado como el que se observa con la inhibición del proteosoma con epoxomicina 1  $\mu$ M (Fig. 44). Además, la acumulación de conjugados ubiquitina-proteína fue mayor a las 6 h y 12 h del proceso de enquistación. Es probable que la enzima 10S y el proteosoma estén participando conjuntamente en los procesos de degradación de proteínas ubiquitinadas y por tanto la inhibición de alguno de los dos genera algún grado de acumulación de sustratos conjugados. El menor efecto luego de la inhibición de la actividad tripeptidil peptidasa puede relacionarse con que el proteosoma permanece activo y puede suplir en parte la ausencia de actividad de esta enzima. El efecto más marcado en las primeras horas de la enquistación puede deberse a la presencia de un mayor número de sustratos ubiquitinados durante esta fase del proceso y muy probablemente esté relacionado con el pico de actividad peptidasa observado a las 24 h (Fig. 37).





**Figura 44. Efecto de la Inhibición de la Actividad Tripeptidil Peptidasa sobre los Patrones de Ubiquitinación Durante la Enquistación de *G. intestinalis*.** Se indujo el proceso de enquistación *in vitro* (Kane et al, 1991), en presencia del inhibidor H-Ala-Ala-Phe-CHCl<sub>2</sub>, 50 uM (T). Como controles se incluyeron parásitos inducidos a enquistar adicionados con DMSO (C) y parásitos tratados con epoxomicina 1 uM (I). **A.** Western blot con anticuerpo Anti-UbGi de un SDS-PAGE en gel Tris Glicina T:15%. 100,000 trofozoitos en cada carril. 0, 6, 12, 24 y 48 horas del proceso de enquistación. **B.** Ensayo de Western blot control del proceso de enquistación A, con anticuerpo anti-CWP1 1:2000.

### **6.13. Inhibición Conjunta del Proteosoma y de la Actividad Tripeptidil Peptidasa en Cultivo de Trofozoítos y en la Enquistación**

Para evaluar el efecto de la inhibición conjunta del proteosoma y de la actividad tripeptidil peptidasa, se realizaron ensayos de inhibición en cultivo de trofozoítos y durante el proceso de enquistación. Se evaluó el efecto de un inhibidor muy específico del proteosoma, epoxomicina, 1  $\mu\text{M}$  junto con AAFCMK, 50  $\mu\text{M}$  y del inhibidor del proteosoma MG132, 50  $\mu\text{M}$  junto con AAFCMK, 50  $\mu\text{M}$ . Los resultados de la figura 45 muestran el efecto de estos dos tratamientos sobre el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*. Se observó una leve disminución en el número de parásitos a las 24 h postinhibición, sin la presencia de alteraciones morfológicas o evidencia de incremento en la mortalidad celular. Este efecto se debe a un incremento en el tiempo de duplicación celular como se observa en la figura 46, en la cual se aprecia una reducción en el número de duplicaciones. Este efecto fue levemente más marcado en el tratamiento con epoxomicina más AAFCMK. Estos resultados muestran que la inhibición conjunta de la actividad proteosomal y la actividad tripeptidil peptidasa en la fase de replicación activa de *G. intestinalis* no tiene un efecto aditivo. El patrón de comportamiento de las curvas de crecimiento es muy similar al observado con la inhibición individual con estos compuestos (Fig. 25 y Fig. 41).

Por el contrario, cuando estos tratamientos son aplicados a parásitos inducidos a enquistar, el efecto sobre este proceso de diferenciación es muy marcado, observándose una ausencia total de la formación de quistes (Fig. 47). Estos hallazgos junto con los resultados de niveles de actividad peptidasa en trofozoítos y durante el proceso de enquistación (Fig. 37 y Fig. 38) indican que *G. intestinalis* posee una actividad peptidasa proteosomal y una actividad peptidasa similar al proteosoma (actividad tripeptidil peptidasa) que son basales durante la fase de replicación activa del parásito (Fig. 38) y al parecer no son esenciales para los procesos de duplicación celular. Sin embargo, no se debe descartar la presencia de mecanismos compensatorios, específicos que se pueden activar durante esta fase del ciclo de vida de *Giardia*, y que permitirían superar rápidamente la inhibición individual o conjunta de estas dos actividades enzimáticas. Muy diferente es el panorama para el proceso de enquistación, durante el cual se observó un incremento muy marcado de estas actividades peptidasa (Fig. 37 y Fig. 38), con efectos sobre viabilidad y eficiencia de enquistación (Fig. 27 y Fig. 43) cuando se realizó inhibición individual del proteosoma y de la actividad tripeptidil peptidasa, respectivamente y con inhibición total del proceso cuando se inhibieron estas dos actividades enzimáticas (Fig. 47). Estos resultados indican que la actividad