

UNIVERSIDAD DE GRANADA



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PROTEINAS
CAPACES DE LIGAR ACIDOS GRASOS EN
*GIARDIA LAMBLIA***

TESIS DOCTORAL

RAFAEL DIAZ DE LA GUARDIA QUILES

GRANADA, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rafael Díaz de la Guardia Quiles
D.L.: Gr. 2463 - 2006
ISBN: 84-338-4178-5

Memoria presentada para optar a la tesis doctoral por la Universidad de Granada.

La siguiente investigación ha sido realizada en el laboratorio de Parasitología Molecular (Instituto de Biotecnología) y Departamento de Genética de la Universidad de Granada.

Los directores.

Prof. Dr. Antonio Osuna Carrillo de albornoz

Prof. Miguel Burgos Poyatos

El Autor.

Rafael Díaz de la Guardia Quiles

Granada 2006

Trabajo financiado por el proyecto de investigación FEDER C.I.C y T. N°1FD 97- 0781, y por la beca concedida por la Universidad de Granada mediante el plan propio.

INDICE

1 <u>INTRODUCCION.</u>	9
1.1 Introducción general.....	9
1.2 El parásito: <i>Giardia lamblia</i>	10
1.2.1 El metabolismo energético de <i>Giardia</i>	13
1.2.2 Ciclo de vida.....	14
1.3 La Giardiosis.....	17
1.3.1 Mecanismos de la mala absorción y diarrea.....	18
1.4 Diagnóstico.....	19
1.5 Tratamiento.....	27
1.6 Epidemiología.....	28
1.7 Las proteínas capaces de ligar ácidos grasos.....	29
1.7.1 Las proteínas asociadas a la membrana, capaces de ligar ácidos grasos.....	30
1.7.2 Las proteínas citosólicas capaces de ligar ácidos grasos.....	31
1.7.3 Estructura y capacidad de ligar ácidos grasos.....	32
1.7.4 El plegamiento de las FABP y su dependencia del pH.....	33
1.7.5 Las funciones biológicas de las FABP.....	34
1.7.5.1. La fijación y transporte intracelular de los ácidos grasos.....	34
1.7.5.2 Las funciones de estas proteínas en la transducción de señales.....	35
1.7.5.3 Funciones que poseen en el crecimiento celular y en la diferenciación.....	35
1.7.5.4 Las funciones que poseen como protectores celulares.....	35
2 <u>MATERIAL Y MÉTODOS.</u>	37
2.1 Cultivo de los trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i>	37
2.2 Mantenimiento de <i>Giardia lamblia</i> por criopreservación.....	39
2.3 Preparación del homogenado.....	39

2.4 Purificación de proteínas mediante técnicas de Cromatografía.....	40
2.4.1 Cromatografía en columna de Bio-Bead.....	40
2.4.2 Cromatografía en Columna de Lipidex.....	40
2.4.3 Cromatografía en Columna de Afinidad.....	41
2.5 Análisis del rendimiento de la purificación.....	43
2.5.1 Procedimiento del análisis.....	43
2.5.2 Rendimiento en los pasos de la purificación.....	43
2.6 Técnicas de Electroforesis.....	45
2.6.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS.....	45
2.6.1.1 Los Geles de Poliacrilamida.....	45
2.6.1.2 La preparación de las muestras.....	47
2.6.1.3 Tinción de los geles.....	48
2.7 Transferencia de Proteínas.....	49
2.7.1 Los materiales y reactivos.....	49
2.8 Fragmentación en péptidos de las proteínas.....	50
2.9 Capacidad de desplazamiento del ácido oleico radiactivo.....	51
2.9.1 Extracción de proteínas de un gel de poliacrilamida para la realización de mediciones de centelleo.....	52
2.10 Determinación del peso molecular mediante espectrometría de Maldi-tof.....	53
2.11 3' RACE de la FABP de <i>Giardia lamblia</i>	53
2.12 Genoteca de expresión.....	58
2.12.1 Eliminación de RNAsas del material a utilizar... ..	58
2.12.2 Obtención de los mRNA de <i>Giardia lamblia</i>	59
2.12.3 Construcción de la Genoteca de expresión de <i>Giardia lamblia</i>	62
2.12.3.1 Síntesis de la primera hebra de cDNA.....	63
2.12.3.2 Síntesis de la segunda hebra de cDNA.....	64
2.12.3.3 Unión de la secuencia Sal I a los cDNA.....	68
2.12.3.4 Reacción de digestión con el enzima Not I.....	69
2.12.3.5 Purificación del cDNA mediante cromatografía.....	70
2.12.3.6 Ligado de los cDNA al vector de clonación.....	72

2.12.4 Comprobación de la eficiencia de transformación.....	77
2.12.5 Amplificación de la genoteca.....	80
2.12.6 Inmunización de los ratones para el rastreo.....	81
2.12.6.1 Valoración de la inmunización. Método de ELISA.....	82
2.12.7 Adsorción de los sueros.....	83
2.12.8 Activación de las membranas.....	85
2.12.9 Rastreo de la genoteca.....	85
2.12.10 Secuenciación de los clones positivos.....	88
2.12.11 Pruebas inmunológicas.....	90
2.12.11.1 Purificación de las proteínas totales de las bacterias con el inserto seleccionado.....	90
3 <u>RESULTADOS.</u>	94
3.1 Resultados del rendimiento en la purificación de las proteínas FABP.....	94
3.2 Análisis de las electroforesis de las FABP.....	95
3.3 Resultados de la prueba del Manditof.....	96
3.4 Composición en aminoácidos de las FABP.....	96
3.5 Análisis de las agrupaciones de fragmentos de las proteínas.....	98
3.6 Análisis del desplazamiento con ácido oleico radiactivo.....	99
3.7 Valoración de la amplificación del cDNA de las FABP de <i>Giardia</i> , mediante PCR.....	100
3.8 Comprobación del estado de los mRNA utilizados en la construcción de la genoteca.....	111
3.9 Síntesis del cDNA.....	112
3.10 Comprobación de la existencia de inserto en el interior de los plásmidos.....	113
3.11 Rastreo de la genoteca de expresión mediante anticuerpos.....	115
3.12 Secuenciación de los clones positivos.....	116

3.13	Análisis mediante electroforesis de las proteínas del clon positivo GCR3-4.....	121
3.14	Análisis mediante westernblot de las proteínas del clon positivo GCR3-4, detectadas con los sueros de los ratones inmunizados con las FABP.	123
3.15	Análisis mediante westernblot de las proteínas del clon positivo GCR3-4, detectadas con las salivas de personas afectadas por Giardiosis.....	124
4	<u>DISCUSION.</u>	125
5	<u>CONCLUSIONES.</u>	139
6	<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	141

1 INTRODUCCIÓN.

1.1 Introducción general.

Giardia es un protozoo flagelado que infecta el tracto superior del intestino delgado de muchas especies de vertebrados, entre las que se encuentra el hombre, siendo *Giardia lamblia* la causa más frecuente de infección gastrointestinal humana producida por protozoos parásitos (Heyworth, 1996). Actualmente se considera como el parásito más extendido y común de los que afectan al ser humano, siendo más frecuente en niños que en adultos, y más frecuente en climas templados y calidos que en los climas de regiones frías.

Para las células, la necesidad de captación y metabolización de los ácidos grasos es esencial. Los niveles de energía que le proporcionan a la célula con su oxidación, son mucho más altos que los generados por los azúcares (Van der Vusse y col., 1992). Participan en la formación de membranas, y forman parte de rutas metabólicas biosintéticas para la síntesis de compuestos necesarios para la vida.

Durante mucho tiempo, se había pensado que los ácidos grasos atravesaban pasivamente las membranas de las células en función de su hidrofobicidad, llegando por una simple difusión hasta el citoplasma y orgánulos donde son almacenados o metabolizados (Woodside y Heimberg, 1978).

En 1971, como resultado de varios experimentos rutinarios, estudiando la absorción intestinal de la cadena larga de los ácidos grasos, se observó la unión no covalente del oleato [^{14}C] a proteínas de bajo peso molecular de origen citoplasmático, demostrándose la relación entre dichas proteínas y la absorción de los ácidos grasos (Ockner y col., 1972b). A dichas proteínas las designaron como *fatty acid binding protein* (FABP), traducción inglesa de la función descrita (Ockner, y col., 1972a).

Se pensó que este tipo de proteínas deberían tener una gran implicación en el metabolismo de los lípidos. Esta idea se fortaleció cuando se las encontró en tejidos reconocidos por su activa metabolización de ácidos grasos, comprobando su presencia en el citosol de células hepáticas e intestinales.

De muchas de ellas, se conoce ya su secuencia y estructura, habiéndose llegado a clasificar en familias.

Una familia de FABP muy estudiada, de localización citosólica, de 14 kDa, se ha encontrado en células de animales superiores y de helmintos, donde llegan a constituir del 2 al 3 % de las proteínas citosólicas totales, sobre todo en los tejidos con un activo metabolismo lipídico (Frolov y Schroeder,

1997). Estas proteínas de localización citosólica, están sin embargo muy relacionadas con las membranas microsomales y mitocondriales (Jolly y col., 1997; Veerkamp y col., 2000).

Estas proteínas, como veremos posteriormente de forma mas detallada, facilitan la capacidad para sintetizar fosfolípidos (Murphy y col., 1999), ligan ácidos grasos libres y ácidos grasos esterificados acyl-CoA, sales biliares, hormonas, ácido retinóico, al grupo hemo y algunas moléculas más hidrofóbicas (Veerkamp y col., 1991; Sha y col., 1993; Bass, 1994; Baier y col., 1995). Participan también en funciones nucleares relacionadas con el metabolismo lipídico, como el factor de activación de los peroxisomas y del retinol (Bass, 1993). Muchos estudios vienen a confirmar, que las FABP incrementan y facilitan la solubilidad de los ácidos grasos, necesaria para el transporte de los mismos, desde las membranas hasta los compartimentos citoplasmáticos (Tipping y Ketterer, 1981).

En este estudio, vamos a caracterizar algunas de las propiedades que presenta una proteína de *Giardia*, aislada en nuestro laboratorio, que posee características similares a una FABP, además de intentar conocer tanto la secuencia de aminoácidos que la componen, como la secuencia de nucleótidos que los codifican.

1.2 El Parásito: *Giardia lamblia*.

Giardia lamblia, fue descubierto por Leeuwenhoek en 1681 y descrito por Lambl en 1859. Los organismos que pertenecen al género *Giardia*, son protozoos flagelados que clásicamente se han incluido en el Sub-Reino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora, Clase Zoomastigophorea, Orden Diplomonadida y Familia Hexamitidae, estando muy emparentados con otro diplomonádido flagelado llamado Octomitius, según recientes estudios filogenéticos basados en el análisis de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (Keeling y Brugerolle, 2006). El genero en el que se encuadra incluye otras especies como *Giardia agilis* de anfibios, *Giardia muris* de roedores y pájaros, y por último *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis* o *Giardia duodenalis*, este último, responsable de la infección en mamíferos, entre los que se incluye al hombre.

FIGURA 1.

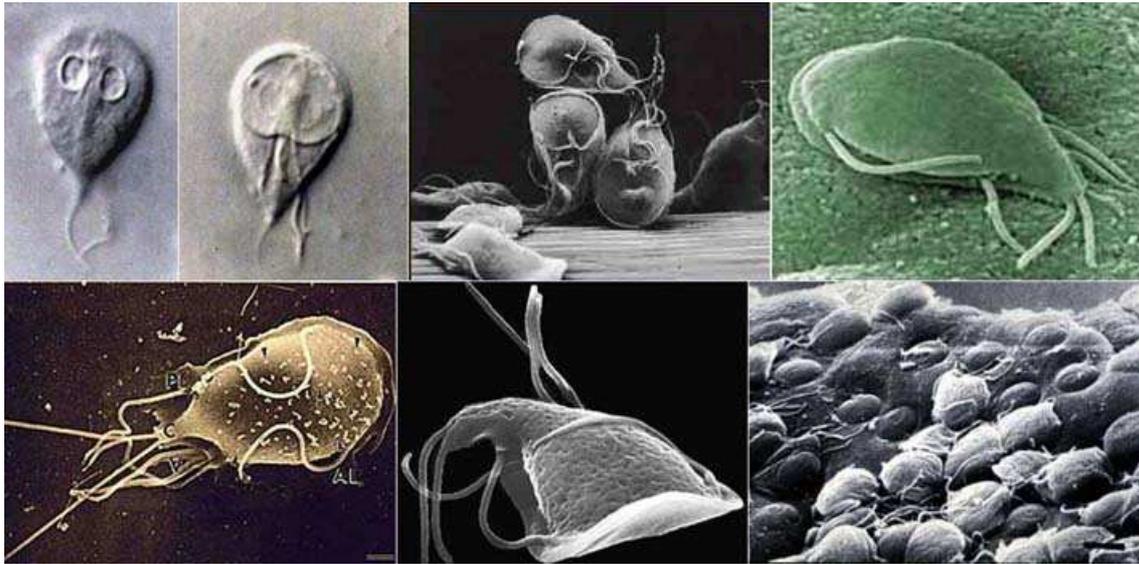


Fig. 1. Diversas fotografías tomadas de los trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Estudios recientes (Kolisko y col., 2005; Sugaya y Otsuka, 2002; Morrison y col., 2002) basados en el análisis de las secuencias de los RNA ribosómicos, en la comparación de diferentes familias de genes, en la escasa presencia de intrones en su DNA, en la falta de reproducción sexual, y en la ausencia de mitocondrias en su citoplasma, tienden a considerarlo como un organismo de características muy primitivas, en posición basal de la filogenia molecular, aislado al igual que el resto de los Diplomonádidos, de los restantes flagelados. Algunos estudios llegan un poco más lejos, y colocan a *Giardia* como un ejemplo de la aparición de la reproducción sexual en la naturaleza, teniendo este mecanismo en el parásito otra función muy diferente de la propia reproducción, como es la resistencia de este a las condiciones adversas, pudiéndose catalogar como un posible eslabón perdido de la reproducción sexual (Staffan G. Svärd. y col., 2003).

El trofozoito de *Giardia* tiene forma de “pera” o “careta africana”, con la parte anterior ancha y redondeada, y la parte posterior estrecha y terminada en punta. Tiene un gran disco “adhesivo” en posición ventral formado por microtúbulos colocados en espiral, que están constituidos por tubulina y giardina que se disponen siguiendo las manecillas del reloj. Presenta dos grandes núcleos ovales, con 5 cromosomas en cada uno, con un número de genes estimado en 1.2×10^7 pb de DNA, con una cantidad de GC del 46% (Adam, 2000). Posee un endosoma central bien diferenciado, además de dos estructuras centrales de microtúbulos curvados denominados cuerpos medios, que se encuentran situados detrás del disco adhesivo (Fig.2).

FIGURA 2.

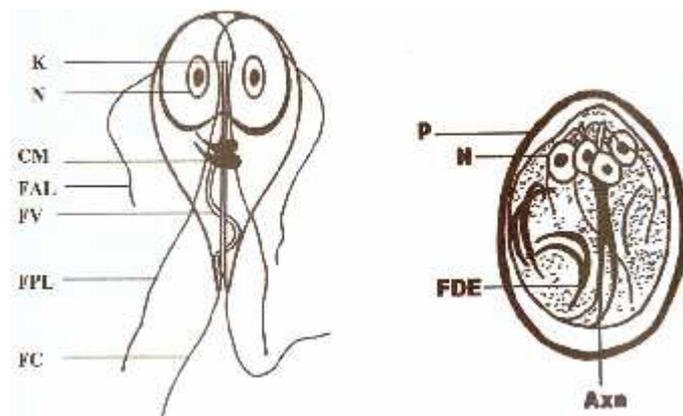


Fig. 2. Trofozoito de *Giardia lamblia* (A). Donde se pueden observar las siguientes estructuras: Kinetosomas (K), cuerpos medios (CM), flagelos antero-laterales (FAL), flagelos ventrales (FV), flagelos postero-laterales (FPL) y flagelos caudales (FC). Quiste de *Giardia lamblia* (B), donde se pueden observar la pared (P), el núcleo (N), los fragmentos del disco estriado (FDE) y los axonemas (Axn).

Tiene cuatro pares de flagelos, que se orientan en el complejo kinetosomal. Un par antero-lateral, que se cruzan intracitoplasmáticamente originando el quiasma, y que posteriormente giran hacia atrás. Un par postero-lateral, un par ventral, y un tercer par caudal. Los axonemas de estos tres últimos pares, se encuentran en el interior del citosol dirigidos hacia atrás.

El trofozoito posee forma convexa dorsalmente, con simetría bilateral. Mide de 12-15 μm de largo, con 5-9 μm en su parte más ancha y de 1-2 μm de espesor.

En *Giardia*, un organismo eucariótico, faltan sin embargo algunos orgánulos típicos y característicos de los eucarióticos como son las mitocondrias y peroxisomas. Además, en los trofozoitos, al igual que en los restantes protozoos, falta visiblemente el aparato de Golgi (Lujan y col., 1995^a). Todo esto, junto con lo anteriormente mencionado, hace que actualmente se le incluya dentro de los eucariontes más primitivos, es decir dentro del grupo de los Archeozoa.

Los trofozoitos poseen una alimentación por pinocitosis, habiéndose descrito vacuolas digestivas cerca de la superficie dorsal (Meyer, 1990).

Los quistes, son las formas de resistencia del parásito, y pueden permanecer viables hasta meses, si se conservan en lugares húmedos y fríos. La forma de los quistes es elíptica u oval, midiendo aproximadamente de 6-10 μm de largo. La pared es quística, fibrosa, y mide unos 0.3-0.5 μm

de espesor. Los quistes pueden tener 2 o 4 núcleos dependiendo del estadio en el que se les encuentre, y dependiendo de si ha comenzado o no la división celular en su interior.

En el citoplasma, se encuentran los axonemas de los flagelos. Estas estructuras son lineales, aunque mantienen una forma parecida a la de media luna. También se encuentran en el citoplasma vacuolas, cuerpos parabasales, cuerpos medios y segmentos del retículo endoplasmático (Feely y col., 1990).

FIGURA 3.

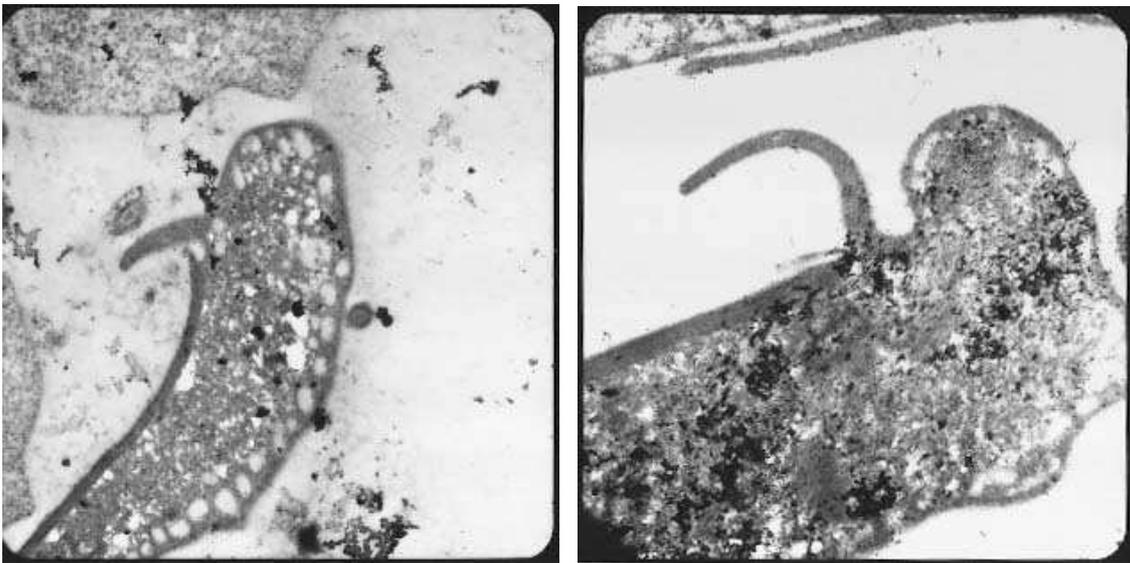


Fig. 3. Fotografías tomadas mediante Microscopía Electrónica de los cortes longitudinales de dos trofozoítos de *Giardia*.

1.2.1 El metabolismo energético de *Giardia*.

En ausencia completa de oxígeno, los trofozoitos de *G. lamblia* metabolizan la glucosa hasta etanol o alanina, mientras que a concentraciones sub-tóxicas de oxígeno, los productos finales son CO₂ y acetato (Paget y col., 1990, 1993).

El metabolismo energético de este flagelado esta ligado al metabolismo de algunos aminoácidos, entre los que se encuentra la arginina, que constituye su principal fuente de energía, y la alanina, producto final del metabolismo en su ambiente natural (Edwards y col., 1989). Los trofozoitos poseen un mecanismo de transporte para captar la alanina, a pesar de que pueden producirla desde piruvato, mediante el enzima alanin amino-transferasa.

Sin embargo, bajo ciertas condiciones, la propia alanina se puede convertir en la mayor fuente de energía para este protozoo.

Los trofozoitos de *G. lamblia* deben incorporar lípidos o ácidos grasos, ya que la glucosa, la treonina, el acetato e incluso el acetil-CoA generado durante el metabolismo de la glucosa, no son usados en la biosíntesis de estos (Jarroll y col., 1981), por lo tanto, los trofozoitos de *Giardia* dependen casi exclusivamente para vivir de los lípidos preformados, puesto que son incapaces de sintetizarlos “de novo” (Jarroll y col., 1989). Dichos lípidos son incorporados de su hospedador por medio de diferentes métodos, bien por medio de lipoproteínas, o mediante micelas formadas por las sales biliares (Lujan y col., 1996). En este contexto, los trofozoitos de *Giardia* incorporan ácidos grasos tales como el araquidónico o el palmítico, tanto en fosfolípidos como en lípidos neutros (Blair y Weller, 1987; Hiltbold y col., 2000).

Los ácidos grasos que mayoritariamente se encuentran en *G. lamblia* son palmítico y esteárico como ácidos grasos saturados, y oleico y linoleico como insaturados (Das S. y col., 2002).

Se ha descrito la presencia del enzima “ácido graso desaturasa”, capaz de introducir dobles enlaces en los ácidos grasos que incorpora. Estos ácidos grasos saturados, transformados por el enzima, son incorporados entre los fosfolípidos de membrana, así como en ácidos grasos citosólicos. De este modo, *Giardia* es capaz de remodelar los ácidos grasos que captura (Ellis y col., 1996).

Giardia incorpora un 90% de ácido palmítico, mientras que solo incorpora un 10% de araquidónico (Gibson y col., 1999). Incorpora también ácidos grasos en forma de fosfolípidos, tanto mediante vía de acilación como mediante la vía re-acylación (Stevens y col., 1997; Gibson y col., 1999; Das y col., 2001, 2002). Recientemente, una proteína capaz de ligar ácidos grasos, ha sido caracterizada en nuestro laboratorio, en los trofozoitos de *Giardia* (Hasan S. y col., 2002a), constituyendo un posible mecanismo de captación y transporte de los ácidos grasos al interior del citosol del protozoo.

1.2.2 Ciclo de vida.

En el ciclo de vida, se incluyen dos etapas:

- El trofozoito, que representa la forma vegetativa, que se localiza en el intestino y que posee dos núcleos, como hemos comentado anteriormente.
- El quiste, que representa la forma infecciosa y resistente, que posee 4 núcleos.

FIGURA 4.

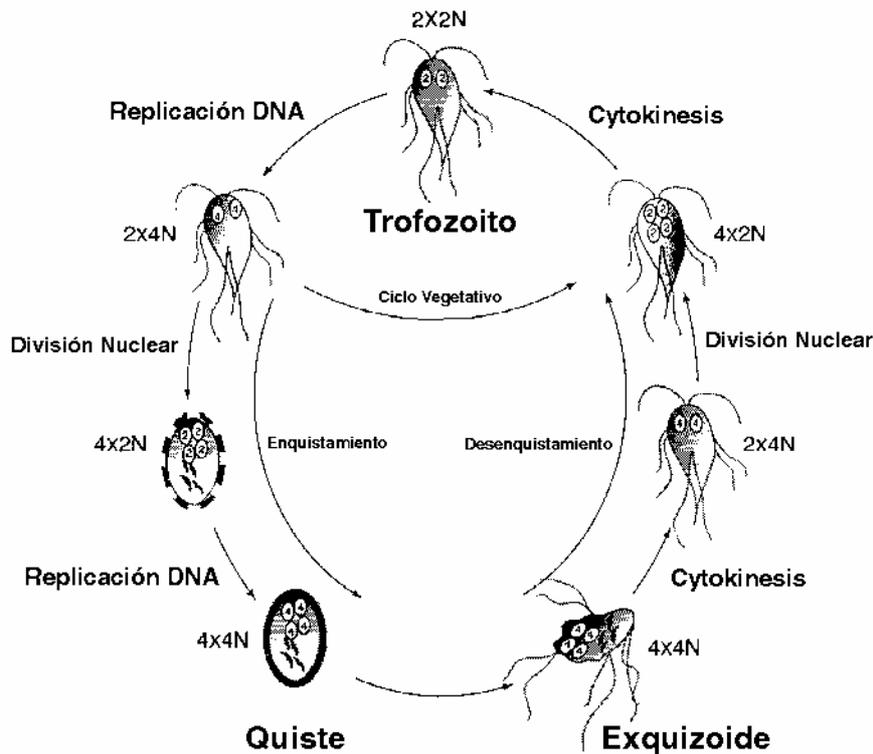


Fig. 4. El ciclo de vida de *Giardia lamblia*. *Giardia* tiene un ciclo vegetativo, donde los trofozoítos oscilan entre 4N y 8N. Cuando se induce el enquistamiento, en *Giardia* diferenciamos las formas G2 o M. Mas tarde, durante el enquistamiento, los dos núcleos se dividen y el DNA es replicado, generando quistes con una haploidía de 16 N. Luego, comienza el desenquistamiento, con 4 núcleos y una haploidía de 16 N. El exquizoide se divide dos veces sin replicación de DNA y se forman cuatro trofozoítos.

La infección empieza cuando los quistes son ingeridos, y estos se desenquistan en el duodeno tras su activación gracias al pH ácido del estómago. Durante este proceso, las enzimas proteolíticas digestivas ejercen su acción sobre la pared del quiste, liberándose posteriormente en el duodeno dos trofozoitos por cada quiste ingerido. En el intestino delgado, las sales biliares a bajas concentraciones, la baja tensión de oxígeno y el bajo potencial ReDox generan las condiciones necesarias para el desenquistamiento y crecimiento del protozoo (Keister, 1983; Farthing y col., 1983). Otro factor favorable al crecimiento es el estado de la mucosa intestinal (Lev y col., 1986).

Giardia duodenalis no penetra en la mucosa como ocurre con *G. muris*, donde a los trofozoitos se les encuentra en el interior de tejidos profundos del intestino del ratón al que parasitan (Owen RL y col., 1981).

Los trofozoitos, se establecen sobre la superficie de las vellosidades en el duodeno y la primera porción del yeyuno, en un medio con pH entre 6,8-7,2. Se fijan mediante el disco adhesivo, y con la ayuda de receptores específicos como la “Alpha-1 Giardina” que son proteínas altamente inmunogénicas (Weiland y col., 2003), que establecen “interacciones receptor-ligando”, y alteran de este modo la topografía de los enterocitos, puesto que acortan la longitud de las microvellosidades. No obstante, hay otras teorías en las que se explica la unión de los trofozoitos a las células mediante fuerzas hidrodinámicas, gracias la presión negativa ejercida por el batir de los flagelos, mientras que Katelaris y col., 1995, demuestran no obstante, que la unión se realiza mediante la intervención del citoesqueleto del protozoo. Sin embargo, estudios recientes de Sousa y col., 2001, mantienen que lo que realmente se produce es una combinación de fuerzas mecánicas e hidrodinámicas en la unión entre los trofozoitos y enterocitos. Si bien, se ha descrito además la existencia de una lectina en la superficie de *Giardia* con especificidad para los residuos D-galactosa y D-manosa presentes en la superficie de los enterocitos, que actuarían como receptores de esta (Farthing y col., 1986b).

Mientras que algunos estudios parecen mostrar que *Giardia* “*in vitro*” no muestra toxicidad frente a células co-cultivadas, otros estudios ponen de manifiesto que contiene una proteína rica en cisterna llamada CRP136, cuyo gen que la codifica posee una homología del 57% con el gen de la sarafotoxina, péptido tóxico, vaso activo, producido por la serpiente *Atractaspis engaddensis*. La ingesta oral de dicha toxina, induce una sintomatología parecida a la de los humanos infectados agudamente con *Giardia* (Chen N., y col., 1995). La CRP136, constituiría por tanto la primera evidencia de la existencia de una toxina encontrada en *Giardia*.

La formación de los quistes se lleva a cabo cuando el parásito se desplaza al colon. Los trofozoitos retraen los flagelos en los axonemas, el citoplasma se condensa, y se excretan las proteínas que van a constituir el exoquiste. El proceso de enquistamiento suele durar unas 16 horas y contiene dos fases morfológicas. La primera se inicia con la aparición de una serie de protusiones en la superficie, donde los antígenos del quiste empiezan a hacerse presentes y donde una especie de cubiertas engrosadas, de unos 100nm de diámetro, comienzan a cubrir toda la superficie del parásito, incluyendo el disco succionario. Esta especie de “capuchones” parecen estar conectados con los microfilamentos del citoesqueleto. El trofozoito se suelta del sustrato, y se redondea por una capa de filamentos.

El proceso de enquistamiento “*in vitro*” ha sido inducido en medios donde el contenido de lípidos se ha disminuido y donde se eliminan las sales biliares necesarias para su cultivo (Lujan y col., 1996).

Se ha caracterizado y clonado una proteína de *Giardia* que parece estar relacionada en numerosos procesos celulares, entre los que destaca su implicación sobre el enquistamiento de los trofozoítos, puesto que se ha comprobado que su inhibición bloquea este enquistamiento, jugando un papel muy importante durante este proceso de diferenciación. Este enzima es una proteinquinasa C, y posee varias isoformas (beta, delta, epsilon, theta y zeta) (Bazán-Tejeda y col., 2006).

Los quistes son resistentes, pero no sobreviven a una fuerte cloración (Rice y col., 1982), ni a la sequedad o al calor (Jarroll y col., 1984). El nivel de quistes, por litro de agua, considerados como capaces de inducir una infección, es de tan solo 10 quistes por litro. Los animales domésticos y salvajes, juegan un papel importante tanto en el mantenimiento del ciclo como en la transmisión (Adam RD. y col., 2001).

La posible asociación entre la hipoclorhidria y la giardiosis ha sido tema de debate durante mucho tiempo, puesto que está admitido que la acidez gástrica normal constituye una barrera efectiva a la infección por *Giardia*. La aclorhidria, que está asociada al grupo sanguíneo A, y las evidencias, demuestran que es este, el grupo de población, donde más casos de giardiosis se manifiestan. Dado que la falta de acidez puede estar causada por una malnutrición proteica, la asociación entre estas personas y la parasitación pudiera correlacionarse, si bien las personas desnutridas son a su vez personas con graves carencias inmunológicas.

Algunos datos apuntan a que *Giardia* es un parásito estacional, y en especial de periodos de frío, lo que no sorprende dadas las condiciones extremas que pueden soportar los quistes.

1.3 La Giardiosis.

A la infección producida por *Giardia*, se denomina como giardiosis, y esta, en función de sus síntomas, puede ser sintomática o asintomática, siendo la segunda la más frecuente (Hopkins y Juanek, 1991). Actualmente, se desconocen las causas por las que persiste la infección, y por las que se mantiene la fase diarreica de la enfermedad, pudiéndose considerar las cepas y virulencia del parásito, junto con factores del hospedador, entre los que destaca el estado nutricional y el estado inmunológico de este.

El curso de la infección es muy diverso, con la presencia de infecciones sintomáticas o asintomáticas, dependiendo de la relación hospedador-parásito, y donde algunos factores incrementan la diferente patogenicidad. Entre los factores encontrados destacan las condiciones intestinales locales, como el estado de las mucosas, las sales biliares, la presencia de otros microorganismos intestinales; la patogenicidad de las propias cepas del parásito, y la respuesta inmune del hospedador (Janoff y Smith, 1990).

La infección asintomática suele ser la más común, pero cuando la infección se manifiesta como sintomática, los síntomas más frecuentes son: La pérdida del apetito, náuseas, vómitos, flatulencia, dolor abdominal y diarrea con salida explosiva de heces fétidas de consistencia semi-acuosa o blanda, con ausencia de exudado celular y sangre (Hopkins y Juanek, 1991; Farthing y col., 1986a).

En la infección crónica, la malabsorción de grasas es un problema muy serio de la infección, ya que su excreción en las heces conduce a una pérdida significativa de nutrientes, como causa directa de la esteatorrea. La malabsorción de vitaminas A y C, está también relacionada con la malabsorción de grasas, dado que la vitamina A y su precursor carotinoide necesitan disolverse en los lípidos para ser absorbidos (Mandour y col., 1984, Girard y col., 2006). Deficiencias en la absorción de vitamina B12, ácido fólico, carbohidratos (D-xilosa, lactosa) y proteínas, aparecen también asociadas a la giardiosis (Korman y col., 1990). En definitiva una deficiente digestión de grasas, proteínas y azúcares ocurre en los casos de giardiasis activa crónica, induciendo una sintomatología similar a la de una pancreatitis o síndromes tales como la Celiaquía o la incompatibilidad de la lactosa. (Heikkinen y col., 1995).

1.3.1 Mecanismos de la mala absorción y diarrea.

Los mecanismos por los que *Giardia* causa diarrea y malabsorción siguen siendo polémicos y probablemente multifactoriales (Katelaris y Farthing, 1992). Se sugirió la barrera mecánica de los trofozoitos y la competencia de nutrientes entre el parásito y el hospedador, pero la enorme superficie del intestino delgado y la pequeña masa metabólica relativa del parásito hacen de esta hipótesis insostenible. Existen indicios de que *Giardia* produce varios grados de lesión en la mucosa, al mismo tiempo que influye en las condiciones del lumen intestinal, e interfiere tanto en la digestión como en la absorción.

Lesión en la mucosa.

Las biopsias del intestino delgado de persona afectadas con giardiosis muestran un espectro completo de cambios en sus mucosas, producida por la atrofia de los villi (Hartong y col., 1979), que conlleva asociado un incremento local en la producción de citoquinas proteoalérgicas (Maciorkowska y col., 2006), junto con una reducción del área de superficie de la mucosa del 75% en los casos que mantienen una infección crónica, con la consiguiente malabsorción asociada (Troeger y col., 2006). Estas anomalías están siempre asociadas con la respuesta inflamatoria de la mucosa, donde se produce una migración de linfocitos al epitelio (Hill y col., 1990a). Esta inflamación juega su papel patológico puesto que altera completamente el epitelio (Wright y Tomkins, 1977). La adhesión mecánica o hidrodinámica de los trofozoitos, y las lectinas del protozoo, cuando se ligan a los azúcares de las membranas de los enterocitos, alteran también la estructura y funcionalidad de los villi.

Factores del Lumen.

Varios procesos del lumen intestinal pueden contribuir al mecanismo de la diarrea y malabsorción asociado a la giardiosis. Muchos pacientes con giardiosis tienen un crecimiento bacteriano secundario (Tomkins y col., 1987), con la consecuente alteración mediada por bacterias sobre las sales biliares. La alteración de estas sales biliares, da como resultado una mala solubilización de las grasas ingeridas y la consecuente malabsorción de estas (Halliday y col., 1988).

Los trofozoitos de *Giardia* inhiben las enzimas hidrolíticas del hospedador, demostrándose que la actividad de la tripsina y la lipólisis se alteran en presencia de trofozoitos vivos y/o sonicados (Katelaris y col., 1991). Todo esto ayuda a comprender el porqué de la malabsorción y excreción, tanto de proteínas, como de lípidos y azúcares, con el material fecal.

1.4 Diagnóstico.

El examen de rutina de las heces, es el método normalmente recomendado para el diagnóstico de la mayor parte de los protozoos parásitos (Lynne Shore Garcia., 2001). Sin embargo en el caso concreto de *Giardia*, y dadas las características del ciclo biológico del parásito, puesto que los trofozoitos se encuentran adheridos a la mucosa intestinal, y hay fases de no eliminación de quistes con las heces, hace que sea necesaria el examen de cinco a seis muestras de heces durante varias semanas para poder descartar con seguridad la presencia del parásito. El método denominado

como “Entero-test” basado en la introducción de una cápsula hasta el duodeno, para que los trofozoitos se adhieren a ella, o el sondaje duodenal, son los métodos actualmente recomendados para el mejor diagnóstico de esta parasitosis.

La fluoroscopia y radioscopia pueden mostrar hipermotilidad a nivel de duodeno o yeyuno, y el examen radiológico puede mostrar alteraciones a nivel de la mucosa. Si la etiología de estas alteraciones se demuestra que es provocada por *Giardia*, se puede diagnosticar mediante exámenes repetidos de heces, pero *Giardia* a veces no produce ninguna sintomatología, y como vimos anteriormente, la giardiasis puede confundirse o compartirse con otras etiologías como úlcera, síndrome celíaco, hernia de hiato, pancreatitis, patologías de la vesícula biliar, u otras parasitosis como Strongyloidiasis, o un carcinoma. Curiosamente, se ha descrito en un 19.9%, alteraciones de la retina en niños con *Giardia*, no habiéndose encontrado relación ni con el tratamiento con Metronidazol, ni relación por causas genéticas (Corsi A, y col., 1998).

Se han puesto a punto métodos de diagnóstico inmunológicos, donde empleando anticuerpos monoclonales, estos son capaces de detectar los parásitos en el material fecal, acoplándose a técnicas inmunoenzimáticas o por inmunofluorescencia, (Addiss DG, y col., 1991; Nash TE, y col., 1987a). Otros métodos como el “dot blott” también se han ensayado en la detección de quistes en heces (Vinayak VK, y col., 1991). Todos estos métodos tienen una sensibilidad comparable a las técnicas tradicionales como el “Entero-test” (Thomas GE, y col., 1974). Pero uno de los graves inconvenientes que muestran, es la necesidad de tener que emplear heces frescas y no fijadas, por el hecho de que la mayor parte de los fijadores interfieren con las técnicas inmunológicas.

FIGURA 5.

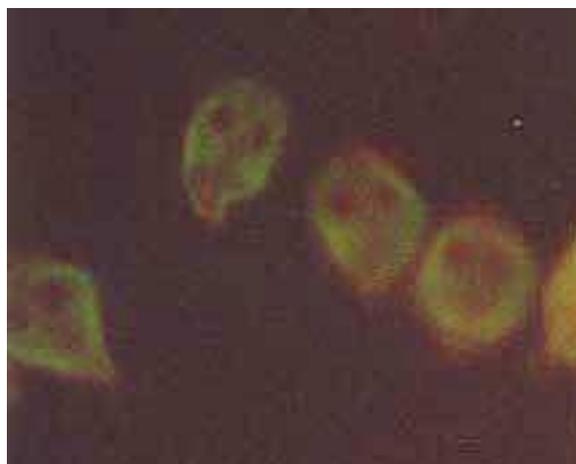


Fig. 5. Fotografías tomada sobre varios trofozoitos de *Giardia* que manifiestan la acción de los anticuerpos fluorescentes frente a membrana utilizados para su detección específica.

Recientemente se han comercializado sistemas inmunocromatográficos donde se detectan quistes tanto de *Giardia*, como de otros parásitos intestinales. Estos métodos, a diferencia de los anteriores, permiten el uso de heces fijadas (Addiss DG, y col., 1992). Otros métodos de detección del material parasitario, pero que sin embargo no son muy utilizados por parte de los laboratorios, son las técnicas basadas en PCR (Guy RA, y col., 2004).

Los métodos inmunológicos clásicos, basados en la detección de anticuerpos circulantes, muestran una gran heterogeneidad en cuanto a los antígenos detectados, y en ningún momento se puede determinar si la giardiosis es una giardiosis ya pasada, una giardiosis activa, o una asintomática (Soliman MM, y col., 1998; Engelkirk y col., 1990; Gobert y col., 1997).

El estudio del reconocimiento antigénico específico por parte de las IgA secretoras (IgAs), que se encuentran en la mucosa y en el intestino, obtenidas de muestras de saliva de individuos con giardiosis activas, llevado a cabo en nuestro laboratorio, mostró que los antígenos de membrana con pesos moleculares de 170, 105, 92, 66, 32, 29, y 14 kDa eran específicos, y no eran reconocidos por las IgAs de individuos curados o no infectados por el protozoo (Rosales-Borjas DM, y col., 1998). En un estudio posterior, se pudo comprobar que una proteína con características similares a una FABP, que era reconocida en el trabajo anterior, era además detectada específicamente por las IgAs de las salivas de los enfermos afectados por *Giardia* (Hasan S., y col., 2002), lo que constituía un buen marcador de la presencia del parásito en los individuos afectados.

La respuesta inmune del hospedador va a estar condicionada por el hecho de que no es un parásito invasor de tejidos, originando una respuesta local, que va a depender de la virulencia de la cepa y la presencia de una pre-inmunidad en el hospedador.

El estímulo antigénico se produce tanto por el quiste, como por el trofozoito, mediante el contacto con la superficie de las mucosas, y en ausencia de pre-inmunidad. La interacción de los trofozoitos con los macrófagos intestinales hace que se inicie la respuesta inmune, induciéndose la eliminación del parásito mediante mecanismos citotóxicos, donde los macrófagos procesan los antígenos del trofozoito, condicionando así la inducción de anticuerpos específicos que pueden ser directamente citotóxicos para los parásitos, o mediados por procesos citotóxicos con la ayuda de los monocitos y granulocitos (Venkatesan y col., 1996). Por ello,

tanto la respuesta celular como la humoral están originadas por las células linfoides asociadas a las mucosas (Faubert, 1996).

La existencia de una respuesta inmune protectora contra *Giardia*, sería la explicación tanto para la resolución espontánea, como para la resistencia a la reinfección, explicándose además el porque de la alta prevalencia de esta en niños menores de cinco años.

Cuando la respuesta inmune se encuentra disminuida, como en el caso de los pacientes con hipogammaglobulinemia o con inmunodeficiencia, se observa un aumento en la prevalencia de la giardiosis, lo que demuestra una dependencia de la respuesta inmune humoral (Petro y col., 1992).

La acumulación de células inflamatorias en la mucosa de los pacientes con giardiosis viene a confirmar, que la respuesta inmune celular puede contribuir a la respuesta inmune del hospedador contra *Giardia*. También se ha visto la presencia de giardiosis activa, en pacientes con altos niveles de IgG anti-trofozoitos, indicando que la presencia de anticuerpos no es suficiente para una protección contra el parásito (Smith y col., 1982).

Las investigaciones en animales de experimentación, muestran que los linfocitos T contribuyen a la respuesta inmune del hospedador, puesto que se a visto en ratones atímicos o con una deficiencia en los linfocitos T, cuando se les inoculan quistes de *Giardia muris*, se produce una infección crónica. Sin embargo, los ratones inmunocompetentes eliminan al parásito y desarrollan una resistencia a la reinfección. De igual manera, la implantación del timo en ratones atímicos produce una reducción progresiva del número de parásitos en los animales infectados.

La infección de *Giardia*, se ha demostrado, que está controlada principalmente por los linfocitos T, puesto que una alteración en estas células, causa la infección crónica persistente (Gottstien y Nash, 1991).

Los animales atímicos presentan una reducción en el número de células T “helper” (Th), con respecto al número de células T citotóxicas/supresoras y macrófagos. Los animales inmunocompetentes pueden eliminar la infección del parásito mientras, que los atímicos no lo hacen, proponiéndose que aunque los macrófagos intestinales y otras células participan en la eliminación de *Giardia*, las células Th son indispensables. En apoyo de esta hipótesis, hay evidencias que muestran que la eliminación in vivo de las células Th CD4⁺ con anticuerpos monoclonales hace que a los ratones sean incapaces de eliminar la infección, mientras que un

tratamiento capaz de eliminar las células T citotóxicas/supresoras CD8⁺ no produce ningún efecto (Heyworth y col., 1987).

Al examinarse las placas de Peyer durante la infección de ratones normales con *Giardia muris* se encontró que las poblaciones de linfocitos T presentaban una relación Th:T-citotóxicas/supresoras de más de (5:1), que se correlaciona con la eliminación del parásito (Carlson y col., 1986). De manera similar, la disminución de linfocitos T CD4⁺ incapacita a los ratones a generar una respuesta IgA secretora intestinal contra los trofozoitos de *Giardia*, desarrollándose la infección crónica. La reducción de células T supresoras o de células NK, no modifica la capacidad de eliminar la infección, reforzándose nuevamente la importancia de las células Th en la respuesta inmune contra *Giardia* (Heyworth, 1989).

Los neutrófilos y eosinófilos, participan junto con los anticuerpos en los mecanismos de eliminación del parásito, mientras que las células NK no parecen tener ningún papel en la eliminación (Heyworth y col., 1986). La producción de IL6 por parte de las células “mast” parece jugar también un papel importante en el control de la giardiosis y eliminación del parásito (Li E, y col., 2004).

A nivel de la mucosa intestinal, los macrófagos de ratón son capaces de fagocitar los trofozoitos de *Giardia muris*, puesto que estos son capaces de invadir esta mucosa. La presencia de macrófagos en la lámina propia facilita el contacto entre el parásito y las células presentadoras del antígeno. Esta capacidad de los macrófagos y monocitos de matar en la lámina propia a los trofozoitos de *Giardia muris*, proporciona un mecanismo importante en la defensa contra los trofozoitos invasores (Hill y Pearson, 1987). También se ha comprobado *in vitro* que tanto los fagocitos polimorfonucleares como los mononucleares humanos, y sobre todo estos últimos, son capaces de fagocitar trofozoitos de *Giardia lamblia*, suponiendo un posible mecanismo adicional de protección contra la giardiosis (Franca-Botelho y col., 2006).

Los leucocitos intestinales intra-epiteliales, presentan una función inmunomoduladora del epitelio, mediante la expresión de moléculas de clase II del sistema mayor de histocompatibilidad, a través de la secreción de un factor tipo interferón, que puede contribuir además, a producir mecanismos inespecíficos como son la diferenciación del epitelio y el recambio de este, la movilidad gastrointestinal, la secreción y la absorción a través de factores aún desconocidos.

La respuesta inmune humoral, como ya anotamos anteriormente, también juega un papel importante en la giardiosis sintomática, algo evidente dada la prevalencia de la enfermedad, en pacientes con hipogammaglobulinemia (LoGalbu y col., 1982), habiéndose observado la destrucción “*in vitro*” de los trofozoitos por los anticuerpos, en presencia del complemento (Den Hollander y col., 1988). Mientras que la IgA murina en presencia del complemento no tiene efecto sobre los trofozoitos (Heyworth, 1992), lo que es explicable dado que la región Fc de la IgA carece de sitios de unión para el componente C1q del complemento, necesario para su activación (Kuby, 1997). Sin embargo, la presencia de IgAs (secretoras) específicas en el intestino, se correlaciona con la eliminación de los trofozoitos del intestino delgado (Snider y Underdown, 1986).

Nash y col. (1988), han descrito como varios anticuerpos monoclonales con especificidad para con una proteína de superficie de 170 kDa presentaban citotoxicidad sin necesidad de la participación del complemento.

En numerosos estudios se ha identificado la presencia de anticuerpos contra *Giardia*, y su prevalencia en el suero. Los primeros trabajos usaron técnicas de ELISA y trofozoitos totales en estudios serológicos, que mostraron que los anticuerpos reconocen antígenos presentes en la superficie del trofozoito (Den Hollander, 1988).

En algunas publicaciones se indica que la IgG sérica presente en los individuos infectados, puede permanecer durante años (Smith y col., 1981), mientras que en otras publicaciones se menciona que se logra inmunonegativizar después del tratamiento con una quimioterapia específica (Den Hollander, 1988). Por otra parte, se ha encontrado que los niveles de IgM disminuyen más rápidamente que los de la IgG, pudiéndose considerar como un criterio para distinguir entre una infección activa de otra ya pasada (Goka y col., 1986).

Un componente importante de la respuesta inmune humoral en humanos parece ser la IgA inducida específicamente (Adam, 1991), ya que se ha demostrado la presencia de IgAs específica en saliva (Speelman y Ljungstrom, 1986) y en leche (Miotti y col., 1985) y se sabe mediante estudios epidemiológicos su efecto protector en recién nacidos (Nayak y col., 1987). La presencia de IgAs específica en estas secreciones sugiere que deben encontrarse anticuerpos similares en el intestino, ya que estos anticuerpos en leche y saliva debieron originarse seguramente en las células productoras de IgA sensibilizadas en el intestino.

Es necesario destacar que el efecto letal de la leche humana normal sobre los trofozoitos de *Giardia* es debido a su contenido en ácidos grasos libres y su efecto detergente sobre la membrana del trofozoíto, y no por la concentración de IgA secretora (Gillin y col., 1983). Este efecto es absolutamente dependiente de la presencia de sales biliares, necesarias para activar la lipasa de la leche “bile salt-stimulated lipase” (BSL). Algunos productos lipolíticos, especialmente los ácidos grasos libres Cis-no saturados, de cadena C₁₆-C₂₀ y algunos monoglicéridos, son tóxicos para los trofozoitos de *Giardia* por su efecto detergente sobre las membranas (Reiner y col., 1986), sin embargo, los trofozoitos se protegen de este efecto gracias al moco intestinal, donde participa una lectina del parásito (Farthing y col., 1986b).

Estudios en modelos experimentales murinos, apoyan la importancia de los anticuerpos en la giardiosis. Así, como se ha mencionado anteriormente, cuando se deprimen ratones de su capacidad de formar anticuerpos bien por tratamiento, o en el momento del nacimiento, con anti-IgM, y posteriormente se infectan con el protozoo, desarrollan giardiosis crónica (Underdown y col., 1988). De igual manera, el tratamiento de ratones con anticuerpos monoclonales contra una glicoproteína de superficie de *Giardia*, reduce de manera significativa la carga parasitaria (Butscher y Faubert, 1988). Se ha observado que las IgG e IgA específicas aumentan la adherencia y fagocitosis de los trofozoitos por los macrófagos y neutrófilos peritoneales (Hill y col., 1990b).

Se han realizado estudios, con el propósito de caracterizar los antígenos de *Giardia* reconocidos por los anticuerpos del hospedador, en donde se han usado anticuerpos séricos, aunque como ya indicamos anteriormente, estos no sean representativos de los que realmente está sucediendo en la infección. Las técnicas usadas en estos trabajos, fueron las de inmunotransferencias e inmunoprecipitaciones de los antígenos de *G. lamblia*, con sueros humanos, pertenecientes a individuos infectados. De este modo, se han identificado antígenos de 88, 72, 57 y 30-34 kDa (Edson y col., 1986; Taylor y Wenman, 1987; Janoff y col., 1988; Nash y col., 1990^a; Char y col., 1991; Adan y col., 1988; Forrest y col., 1990; Wenman y col., 1993, 1986).

Vinayak y col., (1989) describieron un antígeno de membrana de 56 kDa, que se encontraba asociado a infecciones no persistentes. De este modo, los sueros de pacientes con infecciones crónicas, no presentaron una respuesta de IgA contra este antígeno, sugiriendo por tanto, que la formación de anticuerpos IgA contra este antígeno debe ser un factor importante para la eliminación del parásito (Char y col., 1993).

Nash y col. (1990b) mostraron que la respuesta inmune de humanos infectados experimentalmente con el aislado GS/M, estaba dirigida principalmente contra la proteína variable de 72 kDa rica en cisteína. Llama la atención que el suero de los pacientes no reconociera a la proteína después de 22 días de infección, pudiendo indicar que esta proteína de superficie habría cambiado. De esta forma se determina una de las características más interesantes de la biología de *Giardia*, y es su capacidad de variación antigénica. Esta característica se ha demostrado “in vitro” e “in vivo” en infecciones experimentales de humanos y animales (Aggarwal y col., 1988. Müller y col., 1998, 1999. Nash, 1991, 1997). El fenómeno es debido a una familia de proteínas de superficie, rica en cisteína, denominada “variantes proteicas específicas de superficie” (VSPs) (Adam y col., 1988; Aggarwal y col., 1989; Papanastasiou y col., 1997a, b; Stäger y col., 1998a), de las cuales se ha estimado que existen unas 150 variantes específicas de estas proteínas, que pueden estar presentes en la superficie en cualquier momento (Kulakova y col., 2006). El mecanismo que controla la expresión de las VSPs en los trofozoitos no se conoce bien todavía, aunque algunos datos sugieren que la regulación pudiese realizarse a nivel de transcripción (Nash y Mowatt, 1992).

La infección con *G. muris* de ratones inmunocompetentes, produce anticuerpos en el suero y en la mucosa intestinal, contra los antígenos de superficie del trofozoito. En las secreciones intestinales, estos anticuerpos parecen ser exclusivamente de la clase IgAs, mientras que en el suero se presentan IgG e IgA no secretora (Heyworth y Pappo, 1990; Heyworth, 1992). Estos anticuerpos, incubados con los trofozoitos, inhiben su capacidad de infectar ratones, y cuando se transfieren por vía intraperitoneal o intraduodenal, reaccionan con el parásito, observándose una reducción significativa en la intensidad de la infección. Además, ratones recién nacidos se protegen de la infección por la ingestión de leche de ratón que contiene IgAs anti-*Giardia* (Andrews y Hewlett, 1981; Stäger y col., 1998b). El efecto protector de estos anticuerpos IgAs pudiera deberse a la inhibición de la adhesión del trofozoito a las células del epitelio intestinal (Kaplan y Altmanshofer, 1985; Inge y col., 1988) y a la opsonización del protozoo para su destrucción por ingestión fagocitaria (Hill y Pohl, 1990b). Este último proceso puede ser el inicio de la respuesta inmune intestinal contra los trofozoitos de *Giardia*, por la presentación del antígeno procesado por los macrófagos, a los linfocitos de las placas de Peyer.

1.5 Tratamiento.

Para el tratamiento de la giardiosis se recomienda la utilización de varios fármacos, todos derivados del nitroimidazol como el Metronidazol y Tinidazol, o los derivados de acridina como la Quinacrina, y los derivados de nitrofuranos como la Furazolidina.

El Metronidazol es altamente efectivo, y actúa directamente produciendo radicales libres sobre el DNA del parásito (Goodman y Gilman, 1985). La Furazolidina, se utiliza en pediatría por su mínima absorción intestinal, aunque parece ser menos efectiva y su mecanismo de acción aun no se conoce.

La Quinacrina es un colorante amarillento, que se absorbe muy rápido, se libera lentamente, y su eficacia es similar a la de los derivados de nitroimidazol, pero menos tolerada. Su mecanismo de acción sigue siendo desconocido, aunque parece interaccionar con el DNA del parásito, actuando en especial sobre la síntesis del RNA (Upcroft y col., 1996). Ninguno de estos derivados puede ser usado en mujeres embarazadas (Farthing, 1994).

Los derivados del Benzimidazol (como el Albendazole), inhiben la polimerización de la tubulina en los micritúbulos, impidiendo por tanto la adhesión y multiplicación del parásito (Lacey, 1990).

Otro fármaco como es la ciprofloxacina, tiene efectos letales sobre los trofozoitos de *Giardia lamblia*, y puede ser usada como una droga alternativa en tratamientos contra la giardiasis, sobre todo cuando la infección persiste (Sousa y Poiars da Silva, 2001).

Aunque todos estos fármacos se utilizan para el tratamiento de la Giardiosis, todos tienen efectos secundarios y algunos llegan a ser potencialmente cancerosos.

Estos efectos, han hecho que se abra una línea de investigación orientada a la construcción de inmunotoxinas capaces de matar específicamente a *Giardia*, y que puede constituir una alternativa muy relevante para el tratamiento de esta enfermedad. Como objetivo de estudio de esta posibilidad, se ha buscado el empleo de citolisinas procedentes de anémonas marinas (Tejuca y col., 1999). Constituyen una familia de proteínas básicas, muy activas, de 19 kDa de peso molecular, denominadas actinoporinas. Su efecto es la formación de poros oligoméricos e hidrofílicos en la membrana de las células diana, perjudicando las funciones celulares y conduciendo a la muerte del parásito. Sin embargo, su

toxicidad inespecífica puede ser un problema, por lo que para dirigir esta toxicidad específicamente, se ligaría a un anticuerpo dirigido contra el parásito. Se han examinado 3 toxinas, esticolisina I y II, y equinatoxina II, empleando anticuerpos monoclonales o policlonales para que la toxina se una específicamente a los trofozoitos. En estos ensayos, los anticuerpos policlonales han mostrado mejor resultado que los monoclonales debido a la ya mencionada variación antigénica de *Giardia*.

1.6 Epidemiología.

Giardia lamblia, es probablemente el parásito del intestino humano más extendido en el mundo. La fase infecciosa de *Giardia* es el quiste, el cual se expulsa con las heces de los individuos infectados, siendo inmediatamente infectivo sin necesidad de tener un período de maduración, ni período de latencia (Hall, 1994). Los individuos infectados expulsan gran cantidad de quistes durante todo el período que dura la infección.

La giardiosis se encuentra tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, aunque es mucho más frecuente en estos últimos a causa de la alta densidad de población, malnutrición y falta de medidas higiénicas del agua. La prevalencia de la parasitosis aumenta en los niños, a los que les proporciona un cierto grado de inmunidad que les protege frente a futuras infecciones. Esto explicaría la prevalencia de la giardiosis asintomática en los adultos.

La transmisión de esta infección se efectúa exclusivamente tras la ingestión oral de los quistes, bien a través de alimentos contaminados o de aguas de bebida contaminadas con restos fecales, aunque el contacto íntimo con un individuo infectado también contribuye en la transmisión. El parásito tiende a encontrarse más frecuentemente en la población infantil o en grupos humanos que viven en ambientes muy cerrados. Se considera un parásito relativamente común en viajeros, en personas que viven en pobres condiciones socio-sanitarias y entre homosexuales masculinos (Meyers y col., 1977). Algunas profesiones se consideran más expuestas a la infección, como cuidadores infantiles de jardines de la infancia, y personas que se ocupan del tratamiento de aguas residuales y alcantarillados, donde el contacto con los quistes es más frecuente.

El agua contaminada, o inadecuadamente tratada con desinfectantes químicos y que no ha sido filtrada, constituye una fuente común de infección (Steiner y col., 1997; Jakubowski, 1990). Desde el punto de vista epidemiológico, han sido muy bien estudiadas las epidemias producidas por vía hídrica, y cuyo origen ha sido la contaminación por animales

salvajes infectados, siendo los pequeños roedores los más implicados en esta prevalencia del ciclo salvaje, y en su continua transmisión por la ingesta de agua contaminada (Bednarska y col., 2006). Algunas epidemias se han estudiado con gran precisión, como las que han tenido lugar en los últimos años en algunas regiones de Estados Unidos (Levy DA, y col., 1998), llegándose a afectar enormes grupos de población.

1.7 Las proteínas capaces de ligar ácidos grasos.

Los ácidos grasos de cadena larga, son esenciales para poder sintetizar complejos lipídicos tales como triglicéridos, ésteres, fosfolípidos y prostaglandinas. También funcionan muchos de ellos como componentes de señales en la modulación de canales iónicos y en la transmisión sináptica e incluso en la regulación del metabolismo nuclear (Aburrad y col., 1999).

En muchos tejidos, la importancia de los ácidos grasos está relacionada directamente con la energía metabólica de la β -oxidación de estos ácidos grasos.

Los ácidos grasos, suministran más energía que la glucosa. Los requisitos de energía están constantemente cambiando, y las células tienen que adaptar la reserva de lípidos a la demanda que se produzca de ellos. Para ello, los sitios más efectivos para llevar a cabo tal regulación se encuentran a nivel de la membrana plasmática. En el caso de los ácidos grasos, por su naturaleza hidrofóbica y por su creencia teórica de que podían transferirse pasivamente a través de la bicapa de fosfolípidos, no se había propuesto ningún mecanismo de regulación o transporte a nivel de la membrana (Simmonds y col., 1968). Sin embargo, experimentos basados en el transporte de ácidos grasos (Robert y col., 1974; Rose y col., 1990), demostraron que debía existir un transportador que facilitase la entrada y el transporte en el interior de la célula, de los ácidos grasos, puesto que la entrada por difusión que se llevaba a cabo a muy bajo nivel (Gilbert y col., 1969), no explicaba el transporte real de los ácidos grasos. A partir de estos trabajos, y como detallamos posteriormente, se han identificado diversas proteínas específicas, capaces de ligarse de forma reversible y de manera no covalente a los ácidos grasos, aumentando así la solubilidad de de estos en el agua, facilitando por tanto su transporte (Banszak y col., 1994). A un grupo de estas proteínas, se las ha denominado “Proteínas Capaces de Ligar Ácidos Grasos” (FABPs), puesto que poseen la capacidad de transportar ácidos grasos, y como vimos al principio, y se las ha agrupado en familias.

Dependiendo de su situación en la célula, se distinguen dos familias de proteínas FABPs:

- La familia de proteínas FABP que se encuentran asociadas con las membranas celulares, y cuya función es facilitar el transporte de los ácidos grasos, a través de estas membranas, al interior del citosol (Abumrad y col., 1999; Storch y col., 2002).
- La familia de proteínas FABP que se encuentran en el citosol, y cuya función es facilitar el transporte de los ácidos grasos a través de él, hacia los compartimentos celulares donde son necesarios, modulando el metabolismo lipídico intracelular, y regulando la expresión de genes. (Boord y col., 2002). De estas proteínas, se han identificado, 14 diferentes (Weisiger y col., 2002).

1.7.1 Las proteínas asociadas a la membrana, capaces de ligar ácidos grasos.

Varias investigaciones han demostrado la existencia de FABPs asociadas a la membrana de las células. Así, la primera fue descrita por Stremmel (1985a), y se trataba de una proteína de peso molecular 90-93 KDa, a la que denominó FABP pm, presente en la membrana plasmática de las células del hígado de rata (Stremmel y col., 1985a; Schwieterman y col., 1988). Posteriormente fue descrita en otros órganos, como en el intestino (Stremmel y col., 1985b), en el corazón (Stremmel, 1988; Paulussen y col., 1988; Watanabe y col., 1991), cerebro (Kurtz y col., 1994), y algunos otros órganos (Sorrentino y Col., 1988; Campbell y col., 1994). Todas estas proteínas están relacionadas, o son muy parecidas a la aspartatoaminotransferasa mitocondrial. Esta proteína no está integrada en la membrana, pero presenta una elevada afinidad hacia ella (Stump y col., 1993).

Otra proteína de membrana fue identificada por Harmon y col., en 1991, en adipocitos de rata, fue clonada por Abumrad y col., en 1993. Esta proteína posee un peso molecular de 88 KDa y se denominó FAT. Schaffer y Lodish, 1994, purificaron otra proteína de adipocitos de ratón de 63 KDa a la que denominaron FATP. Esta otra proteína se encuentra integrada en la membrana plasmática, y es semejante en tamaño y distribución a la proteína de membrana llamada FAR, que posee un peso molecular 56-60 KDa, aunque difieren bastante en cuanto a sus secuencias de aminoácidos (Fujii y col., 1987). Trigatti en 1991, purificó otra proteína de 22 KDa que poseía también una alta afinidad por los ácidos grasos. Todas estas proteínas mostraron gran afinidad sobre las cadenas largas de los ácidos grasos, y se relacionan fundamentalmente con las FABPs citosólicas.

Desde el aislamiento de la primera proteína FABP de invertebrado aislada del músculo del vuelo de *Schistocerca gregaria* en 1990 por Haunerland y Chisholm, el número de FABPs aisladas de invertebrados ha ido aumentando progresivamente, observando que las diferencias entre las secuencias son apreciables, no estando claras las relaciones con las FABPs de vertebrados, y menos aun entre las propias proteínas de los invertebrados (Esteves y Ehrlich, 2006), teniendo estas últimas un mayor grado de diversidad en los lípidos que ligan, que los observados para las proteínas transportadoras de mamíferos (Lucke y col., 2006).

Estas FABP, debido a su localización, y a la diferente secuencia de aminoácidos que presentan en las diferentes especies animales en las que se las ha encontrado, se les ha demostrado un papel importante de cara al diagnóstico y a la vacunación de algunos parásitos como *Schistosoma*, *Echinococcus*, *Áscaris*, *Fasciola*, *Clonorchis*, etc (Al-Sherbiny y col., 2003; Chabalgoity y col., 1997; Hillyer GV, 2005; Nambi y col., 2005, Moser y col., 1991; Gobert, 1998; Alvite y col., 2001; Cansen y Barret, 1995; Espino y col., 2001; Espino y Hillyer, 2003; Lee y col., 2006).

1.7.2 Las proteínas citosólicas capaces de ligar ácidos grasos.

Las FABP citosólicas, son un grupo de al menos 14 proteínas distintas, donde cada una de ellas muestra un patrón característico de distribución en los tejidos, según sea la función de estos (Ockner y Col, 1972a; Schmitt y Col, 1994; Schaffer y Lodish, 1994; Van Nieuwenhoven y col, 1996).

Contienen entre 126-137 aminoácidos y poseen una semejanza en la secuencia del 20-70 % (Veerkamp y col., 1991; Banaszak y col., 1994). Estas proteínas son más abundantes en aquellos tejidos que poseen un metabolismo activo de ácidos grasos, aunque cada una de estas proteínas se encuentra en un tejido diferente, conteniendo algunos tejidos más de un tipo de FABP citosólicas diferente, no solo por tener varios tipos de células, sino por la expresión de varias proteínas FABPs en la misma célula (Glatz y Vander Vusse, 1996).

Existen además isoformas en estas proteínas con diferencias en su secuencia de tan solo un aminoácido, que origina cambios en su punto isoeléctrico.

Hay distintas explicaciones a la existencia de diferentes puntos isoeléctricos, tales como que el ligando se encuentre ligado y este modifique el punto isoeléctrico, o las modificaciones posteriores a la

traducción que incluyen la oxidación de determinados aminoácidos como la Cys69, o la desaminación del Asn105.

Murphy y col., (1999), demostraron sin embargo, que estas isoformas son estructuras funcionales capaces de ligar y transportar los ácidos grasos, junto con otras sustancias hidrofóbicas.

Los anticuerpos mono o policlonales frente a estas proteínas, muestran además reacción cruzada para con los miembros de esta familia de proteínas, pero no con otros tipos de proteínas, aunque estén involucradas en el metabolismo lipídico. Esto dificulta la posibilidad de obtener una información veraz de la presencia de un tipo específico de FABP cuando se realizan estudios de inmuno-captura de este tipo de proteínas (Veerkamp y col., 1991).

1.7.3 Estructura y capacidad de ligar ácidos grasos.

Se han realizado diversos estudios mediante difracción de rayos X sobre la estructura de las “Proteínas Capaces de Ligar Ácidos Grasos” (FABP), y en estos se muestra una semejanza moderada en cuanto a su estructura primaria, aunque muestran sin embargo, mucha semejanza con respecto a su estructura terciaria. Esta estructura terciaria está constituida por 10 cadenas β antiparalelas de una longitud de 4-10 aminoácidos, unidos por una red de puentes de hidrógeno, y 2 cadenas α -hélices cortas, localizadas entre la primera y la segunda cadena β . Los aminoácidos más conservados de esta estructura, son los que se encuentran en las cadenas β como glicina, asparagina y aspartato, que son necesarios para la formación de las vueltas β (Banaszak y col., 1994; Hodsdon y Cistola, 1997).

Esta estructura a modo de barril, proporciona una cavidad central en la que se insertan los ácidos grasos por su grupo carboxilo, y se cierra con las 2 cadenas α -hélices. Dentro de la cavidad, el ácido graso, y más concretamente su grupo carboxilo y la arginina o la tiroxina, se ligan mediante una interacción iónica al sitio de unión, formándose además, una red de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas que sirven para estabilizar la orientación de la cadena (Xu y col., 1993; Jakoby y col., 1993; Chmurzynska, 2006).

En general, la mayoría de las FABPs, no muestran significativos cambios en su conformación cuando están ligadas al ácido graso, aunque la forma “holo” (La forma ligada), muestra mayor estabilidad que la forma “apo” (la forma no ligada), y esto es así, porque en el interior de la forma “apo” se encuentran 24 moléculas de agua, dispuestas de forma ordenada, las cuales

son expulsadas al ligarse el ácido graso, por lo que el volumen de la forma no ligada no cambia significativamente del volumen de la forma ligada (Storch y col., 1989; Buelt y col., 1990; Hodsdon y Cistola, 1997).

La mayoría de las FABPs, ligan solamente a ácidos grasos de cadena larga y muestran una mayor afinidad por los ácidos grasos no saturados en contra de los ácidos grasos saturados. Sin embargo, algunas FABPs son capaces de ligar retinoides como la A-LBP, sales biliares como la I-LBP o incluso a varios ligandos como la L-FABP (Veerkamp y col., 1991; Bass, 1994). La especificidad frente al ligando, parece estar relacionada con la presencia de un solo aminoácido (Baler y col., 1995; Sha y col., 1993).

La estequiometría de ligar es en general de 1 mol del ligando por 1 mol de la proteína, a excepción de la L-FABP que es capaz de ligar hasta dos ligandos en su interior dependiendo del tamaño de estos.

La conformación del ligando varía entre las FABPs. Así, mientras en la I-FABP el ácido graso mantiene una conformación doblada, en la H-FABP se mantiene en forma de U. También varía la orientación del ácido graso en la forma ligada a la proteína así, la orientación del ácido graso ligado a la L-FABP es contraria a la I-FABP. En la L-FABP el grupo carboxilo del ácido graso se dirige hacia la cara externa, mientras que el grupo carboxilo del ácido graso en la I-FABP se dirige hacia la cara interna. Este hecho se comprobó usando un ensayo de desplazamiento del cis-ácido parinárico con dos ligandos diferentes:

- Un ácido graso monocarboxílico como por ejemplo el palmítico.
- Un ácido graso dicarboxílico como por ejemplo tápsico.

El desplazamiento de los ácidos grasos en la I-FABP era igual, mientras que el desplazamiento por el ácido dicarboxílico en la L-FABP era el doble que el del ácido monocarboxílico, y esto es debido a que posee 2 restos carboxilos.

1.7.4 El plegamiento de las FABP y su dependencia del pH.

El plegamiento del plano β de la I-FABP se logró estudiar dentro de un rango de pH 5-9, y se pudo comprobar que el plegamiento era reversible en equilibrio, mostrando una gran estabilidad. A pH 4 y con una baja concentración de urea (1-3 M) se forma un agregado dependiente del tiempo y de la concentración de sales, mientras que a altas concentraciones de urea (4-6 M) se eliminan estas agregaciones.

La dinámica de plegamiento y desplegamiento no varía sin embargo, entre un rango de pH de entre 6-9, mientras que a pH 10 aparecen fases intermedias entre el plegamiento y desplegamiento. Estas fases intermedias son independientes a las que se forman a pH 4 (Dalessio y Ropson, 1998).

1.7.5 Las funciones biológicas de las FABP.

1.7.5.1 La fijación y transporte intracelular de los ácidos grasos.

Inicialmente, a las FABP, se les atribuyó como función la de transportar intracelularmente cadenas largas de ácidos grasos hasta sus sitios de utilización, puesto que funcionan como translocadores de ácidos grasos a través de la membrana (caso de las FABPs de membrana) (Waggoner y col., 1991), mientras que las FABPs citosólicas juegan un papel similar a la albúmina del plasma (Waggoner y col., 1990; Glatz y col., 1993a). Estas proteínas poseen además funciones adicionales tales como:

- Seleccionar y atrapar substratos lipofílicos (Abumrad y col., 1991; Kiens y col., 1997; Lortaine y col., 1997).
- Compartimentalización de ácidos grasos (Baler y col., 1995).
- Participación directa en el metabolismo como co-factores (Estimuladores o Inhibidores), en reacciones donde los ácidos grasos sean substratos o reguladores (Lalonde y col., 1994).

También se ha comprobado, que existe una relación directa entre la utilización de ácidos grasos y el contenido de FABPs en las células. Las FABP son localizadas en vertebrados, predominantemente, como ya se indicó anteriormente, en tejidos activos del metabolismo de ácidos grasos, como en el hígado, el intestino, tejido adiposo, corazón y músculo esquelético. En estos tejidos, el contenido de estas proteínas está relacionado con su capacidad de oxidar ácidos grasos (Luiken y col., 1999).

Las alteraciones en la actividad del metabolismo lipídico, conducen por lo general cambios en el contenido de FABPs en los tejidos. Por ejemplo, una dieta rica en grasas produce un aumento en la cantidad de FABPs citosólicas del hígado, intestino, corazón y riñón (Glatz y col., 1988; Veerkamp y Van Moerkerk, 1993; Richiere y col., 1994). Cuando mediante técnicas de biología molecular, los fibroblastos de hígado de ratón se transfeccionan con DNA de la L-FABP de rata, estas células muestran un aumento en su capacidad de ligar el oleico, el colesterol, y se activa el metabolismo de los fosfolípidos (Schroeder y col., 1993). Pero sin embargo, si hacemos la transfección de estos fibroblastos con DNA de I-FABP de rata, no se aumenta la capacidad de ligar ácidos grasos, pero se

estimula la incorporación de triacil-glicerol. Estos experimentos vienen si no a confirmar las distintas funciones de estas dos proteínas en el metabolismo celular.

1.7.5.2 Las funciones de estas proteínas en la transducción de señales.

Los ácidos grasos de cadenas largas, poseen además, un papel como mensajeros celulares primarios y secundarios específicos de señales, y como reguladores de la expresión de algunos genes a nivel de la transcripción.

Tanto las FABP asociadas a membrana como las FABP citosólicas poseen un papel fundamental en la transducción de señales en acciones tales como:

- Transportadoras de ácidos grasos y de sus metabolitos, facilitando así la entrada de estos componentes de señales en el interior de las células, mientras que las FABP citosólicas facilitan su transporte intracelular (Glatz y col., 1995; Pecters y col., 1989).
- Reguladoras de la síntesis de compuestos lipofílicos mediante la eliminación de producto final para prevenir la inhibición del mecanismo de “feed-back” (Glatz y col., 1993b).
- Modular la actividad de las hormonas mediante la disponibilidad o ausencia de componentes de señales o mensajeros secundarios que compiten con las hormonas por los sitios de unión de las proteínas diana de estas, en el interior de las células.
- Modular la disponibilidad de ligandos libres, afectando a la transducción de señales. Esta función puede verse afectada por las condiciones ambientales que rodeen a estas proteínas, ya que por ejemplo, un cambio de pH puede afectar a la disposición de los ácidos grasos de algunas FABPs citosólicas.

1.7.5.3 Funciones que poseen en el crecimiento celular y en la diferenciación.

Las FABP son capaces de intervenir tanto en el crecimiento como en la diferenciación celular. De esta forma, se ha comprobado la existencia de una relación directa entre el contenido relativo de L-FABP y la mitogénesis (Sorof, 1994).

1.7.5.4 Las funciones que poseen como protectores celulares.

Los ácidos grasos de cadenas largas y algunos de sus derivados, pueden afectar a la estructura y función de las membranas, ya que participan en la

inhibición de enzimas, modulan receptores de la insulina y glucocorticoides, activan la proteínquinasa o pueden modificar el funcionamiento de los canales iónicos (Kang y Leal, 1996). Las FABP, poseen una enorme importancia como reguladoras y protectoras, controlando la presencia de ácidos grasos libres y de algunos de sus derivados. Esta función es especialmente importante en órganos tales como el corazón, ya que un exceso de ácidos grasos y acyl-CoA podría afectar su metabolismo y bloquear la producción de energía mitocondrial (Glatz y Col, 1993b, 1994).

Estas proteínas están siendo utilizadas como marcadores de diagnóstico para detectar daños celulares o lesiones (Kaptain y Col, 1998). De hecho, las FABPs del plasma se han empleado ya como marcadores de diagnóstico para una detección temprana del infarto de miocardio agudo (Yoshimoto y col., 1995; Glatz y col., 1997; Servonnet y col., 2006), del síndrome coronario agudo (Cavus y col., 2006), en la detención temprana de la aparición de arteriosclerosis, como por ejemplo hipertensión, diabetes, e inflamación cardiovascular, y en la detección de enfermedades hepáticas como la hepatitis (Ishimitsu T. y col., 2005).

FIGURA 6.

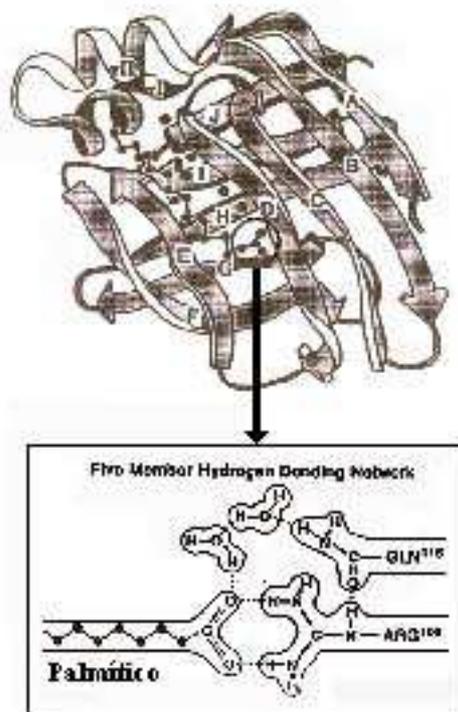


Fig. 6. La estructura de la FABP, muestra la presencia del ácido palmítico en la cavidad central de β -clam junto con algunas moléculas de agua (●). También se observa la red formada por los cinco puentes de hidrógeno, entre los que se encuentra el grupo carboxilo del ácido palmítico.

2 MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Cultivo de los trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Para realizar los ensayos de esta memoria, se han utilizados trofozoítos de *Giardia lamblia*, de las cepas ATCC 30888 y 30957, cultivados en medio TYI-S33, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, y mantenidos a 37° C (Keister, 1983). La composición del medio de cultivo se describe más adelante.

Los frascos de cultivo utilizados fueron diseñados en el laboratorio para conseguir un cultivo en masa. Estos frascos, poseen un tapón a rosca, de un diámetro de 3.5 cm, por 10 cm de altura, en los cuales se introducen 100 capilares de micro-hematocrito de 2 mm de ancho por 5 cm de largo y una luz de 1 mm. Dichos tubos son introducidos en dos discos de teflón perforados, a modo de separadores, para evitar así que se colapsen, manteniendo una separación entre tubos de 2 mm, al objeto todo ello de aumentar la superficie de adherencia de los trofozoítos a la superficie del frasco de cultivo.

FIGURA 7.



Fig. 7. En esta figura se muestran mediante fotografías los distintos detalles que caracterizan a los frascos de cultivo utilizados para la obtención de los trofozoítos de *Giardia*.

El cultivo se realiza durante 72 horas desde el momento de la siembra de trofozoítos, instante en el que se alcanza el máximo crecimiento, siendo los frascos introducidos en hielo a fin de enfriar el medio y lograr el desprendimiento de la mayor parte de los trofozoítos de *Giardia*.

Tomado el medio de cultivo, se centrifuga a 800 g durante 10 min a 4°C. El botón obtenido es lavado repetidas veces con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7,4), para eliminar los restos de medio de cultivo.

Preparación del medio de cultivo TYI-S33.

La composición del medio de cultivo TYI-S33, se describe a continuación:

- K₂HPO₄ 1.0 g.
- KH₂PO₄ 0.6 g.
- NaCl 2.0 g.
- Biosate peptona (BBL, cat. NO 11862) 30 g.
- Bilis bovina (Sigma, cat. NO B-3883) 0.5 g.
- Citrato férrico amónico 0.0228 g.
- H₂O destilada 880 ml.

El medio de cultivo se ajusta a pH 7.2 con NaOH 0.1 N. Este medio, una vez preparado, es filtrado a través de prefiltros, y posteriormente a través de un filtro de 0.45 micras de tamaño de poro, a fin de eliminar los sólidos no disueltos o precipitados. Todos los componentes del medio que no contienen extractos o productos biológicos, son esterilizados en solución, en el autoclave durante 15 min a 121°C y 1.5 atmósferas de presión.

En el momento de su utilización, al medio de cultivo se le añaden por litro, 20 ml de una solución previamente esterilizada por filtración, a través de una membrana de 0.22 micras, y que contiene:

- L-Cisteína 2.2 g.
- Ácido ascórbico 0.2 g.
- Glucosa 10 g.
- H₂O destilada 20 ml.

Como fase final de la preparación del medio, se le añadió un 10% de suero fetal bovino, inactivado previamente a 56 °C durante 30 min. Dicho medio de cultivo puede ser guardado como máximo, a 4 °C, durante 4 o 5 días.

2.2 Mantenimiento de *Giardia lamblia* por criopreservación.

Se emplean para ello cultivos que se encuentran en su fase de crecimiento exponencial, donde una vez que los trofozoítos son centrifugados como se describe anteriormente, el botón resultante es resuspendido en medio de cultivo al que se le adiciona un 10% de glicerol. Esta suspensión de parásitos es vertida en viales de congelación (Nalgene Cryoware).

Posteriormente, se someten estos viales a una congelación progresiva de 1 °C por minuto, hasta alcanzar los -80 °C en un arcón congelador Eraeus, sumergiéndose posteriormente en nitrógeno líquido donde se almacenan a -170 °C.

2.3 Preparación del homogenado.

El sedimento obtenido de la centrifugación del cultivo de *Giardia*, una vez que se le ha dado el último lavado con PBS, es resuspendido en tampón fosfato pH 7.4, conteniendo 0.25 mM de sacarosa, 1mM de EDTA, 1mM de DTT, 1% de Tritón X-100 (Campebell y Col, 1994), junto con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Boehringer Mannheim GMBH). La composición del cóctel de inhibidores de proteasas es la siguiente:

Antipain-HCl	3.0 mg.
Bestatin	0.5 mg.
Cimostatin	1.0 mg.
E-64	3.0 mg.
Leupeptin	0.5 mg.
Pepstatin	0.5 mg.
Fosforamidon	3.0 mg.
Pefabloc SC	20.0 mg.
Aprotinin	0.5 mg.
EDTA	10.0 mg.

El homogenado total, se congela y se descongela 3 veces lentamente, seguido de una sonicación de 1 min a 0°C, que se repite en 10 ocasiones, haciendo descansos de 30 s entre sonicación y sonicación, para así romper las membranas celulares. Comprobándose por microscopía el resultado de la lisis.

El lisado, se incuba a 37°C, durante 30 min en el tampón de lisis, a fin de facilitar la solubilización de las membranas, centrifugándose

posteriormente a 22000 g durante 1 h, y recogiendo el sobrenadante resultante de la centrifugación.

2.4 Purificación de proteínas mediante técnicas de Cromatografía.

La purificación realizada, se ha llevado a cabo mediante diferentes técnicas cromatográficas siguiendo la metodología previamente puesta a punto en nuestro laboratorio por Hasan y col., 2002a; Hasan y col., 2002b y Hasan y col., 2005.

2.4.1 Cromatografía en columna de Bio-Bead.

Tras obtener el lisado, y dado que este fue realizado utilizando para ello un tampón en donde se integra un detergente, hay que tratar de eliminar del homogenado los restos del detergente Tritón X-100 (Cantarero y col. 1980). Para ello, y siguiendo el método descrito por Dutta-Roy (1987), el homogenado fue cromatografiado por una columna de Bio-Beads® SM-2 (BIO-RAD), de 1 x 8 cm que contiene 5 gr de Bio-Bead, previamente regenerada. El homogenado, aproximadamente 5 ml, es cromatografiado a través de la columna de Bio-Bead, a un flujo de 1.8 ml/h, eluyendo con agua destilada. Una vez eliminado el detergente, el homogenado es almacenado a 4 °C, protegido por el cóctel de inhibidores de proteasas.

Para la regeneración de la columna de Bio-Beads, se hacen pasar por ella, 4 ciclos de metanol al 40% y tampón fosfato 10 mM a pH 7.4. Para ello se pasa 1 volumen de metanol, seguido de 1 volumen de tampón fosfato, de forma alternativa, hasta pasar 4 volúmenes de cada uno. Por último, se pasa un volumen más de agua destilada, con el que se lava la columna, quedando regenerada y lista para su reutilización.

2.4.2 Cromatografía en Columna de Lipidex.

A fin de eliminar los componentes biológicos hidrofóbicos, que pudieran interferir en los procesos posteriores a la purificación de las proteínas capaces de ligar los ácidos grasos, el homogenado es cromatografiado a través de una columna de Lipidex-1000 (1x 15 cm) (Lipophilic Sephadex sustituido aprox. 10% w/v Hydroxyalkoxypropyl (Sigma)).

El flujo utilizado en la cromatografía fue de 10 ml/h, recogiendo las proteínas del homogenado mediante su elución con tampón fosfato. El producto cromatografiado resultante, es almacenado a 4°C hasta el momento de su utilización.

La columna fue regenerada mediante tampón fosfato 10 mM a pH 7.4 (Glatz y col., 1984; Lee y col., 1998).

2.4.3 Cromatografía en Columna de Afinidad.

Eliminadas las sustancias hidrofóbicas de la muestra, el homogenado es cromatografiado a través de una columna de afinidad, preparada con Sepharosa Epoxy 4B (Farmacia Biotech), ligada a un ácido graso, que en este caso fue el ácido butírico.

La Sepharosa 4B activada con Epoxy, es un gel-preactivado para la inmovilización de varios ligandos. Este material, reacciona con los grupos hidroxilos además de con otros radicales como aminos y tioles, por lo que es un gel que posee un “brazo” largo hidrofílico adecuado para la inmovilización de moléculas pequeñas.

Preparación del gel, y acoplamiento del ligando.

Para la preparación del gel, se siguen las instrucciones proporcionadas por la casa comercial según el procedimiento descrito por Peters y col. en 1973, en donde las proporciones recomendadas para la preparación de la columna son de 2 volúmenes de ácido butírico, por 1 volumen de Sepharosa 4B y 0.1 M de 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide, con el protocolo siguiente:

- Se pipetea un 20% más del volumen deseado de Sepharosa 4B y se centrifuga a 100 rpm, eliminando así el 20% de etanol que viene con esta, obteniéndose por tanto el volumen deseado de Sepharosa que se va a utilizar.
- Cada mililitro de Sepharosa, es posteriormente lavado con 80 ml de NaCl 0.5M, a 500 rpm, durante 5 min.
- Se disuelve el ligando que se va a utilizar en etanol, y se ajusta el pH a 4.5. En este caso, el ligando a utilizar es el ácido butírico, a un pH de 4.5.
- Se toman 2 volúmenes de ácido butírico y se mezclan con 1 volumen de Sepharosa 4B, y a la suma de los dos volúmenes se le añade 0.1 M de 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide. Se mezcla todo y se tiene en agitación de 2 a 24 horas a temperatura ambiente (Es muy importante no utilizar un agitador magnético para la agitación, dado que este puede romper la Sepharosa 4B).

- Durante las 2 primeras horas se ha de comprobar que el pH de la mezcla no cambie entre un rango de 4 y 6. Si este cambiase, ha de volverse a ajustar el pH con HCl 1N.
- Los grupos no reactivos, son bloqueados mediante ácido acético.
- La columna con la mezcla anteriormente preparada se empaqueta y se lava con 3 volúmenes de Azida Sódica al 0.5%.

Antes de utilizar la columna, se realiza un lavado de regeneración de la misma mediante sucesivos lavados con tampón acetato 0.1M, conteniendo 0.5M de NaCl a pH 4, y con tampón Tris-HCl 0.1M, conteniendo 0.5M de NaCl a pH 8.

Proceso de purificación.

En la realización del proceso de cromatografía y de monitorización de la columna de afinidad, se utilizó un equipo de Pharmacia Fine Chemicals compuesto por:

- Un monitor de ultravioleta UV-1 compuesto, a su vez, por una unidad óptica con una célula de flujo con longitud de onda de operación de 280 nm y una unidad de control ajustada a una sensibilidad de 0.1 unidades de absorbancia (UV).
- Un colector de fracciones FRAC-100, acoplado a la unidad de control del monitor.
- Un registrador gráfico acoplado también a la unidad de control.

Una vez montada y conectada la columna, se procede a equilibrar el sistema pasando PBS 0.25 M, a través de ella, a un flujo de 10 ml/h, hasta conseguir una línea base que es tomada como referencia. Cuando la columna se encuentra equilibrada, se procede a cromatografiar el homogenado de los parásitos, previamente obtenido. Tras lavar con 4 volúmenes de PBS, se eluyen las proteínas retenidas mediante el tampón Tris-HCl 0.1M a pH 7.2 conteniendo 0.5 M de NaCl. Una vez recuperadas las proteínas retenidas, se continúa el proceso regenerando nuevamente la columna.

En el momento en el que las proteínas han sido eluidas, estas son dializadas frente agua destilada durante 72 horas, cambiando el agua cada 3 horas. Las membranas de diálisis utilizadas para este propósito fueron Spectra/Por[®] 3 Spectrum, con un tamaño de exclusión de 3.500 kDa. Estas membranas de diálisis, antes de ser utilizadas, deben ser activadas por ebullición de estas durante 15 min, en una solución compuesta por 10 ml de EDTA 0.2M en 990 ml de agua destilada, conservándose en agua destilada

conteniendo Azida Sódica al 0.02%, que evita su contaminación y deshidratación.

Una vez que las proteínas son dializadas, estas son posteriormente liofilizadas, guardándose a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2.5 Análisis del rendimiento de la purificación.

2.5.1 Procedimiento del análisis.

Partiendo de un volumen inicial de 8.5 ml de tampón de lisis, que es añadido sobre un sedimento de trofozoítos de *Giardia*, obtenido de un cultivo estándar de esta parásito, se recoge un volumen de 500 µl de cada uno de los pasos en los que está constituida la purificación de las proteínas FABP, excepto del último paso, del que se toma el volumen restante obtenido que es de 6.5 ml.

Estos pasos son:

- 1º Paso: Después de lisar los trofozoítos.
- 2º Paso: Después de la centrifugación.
- 3º Paso: Después de la cromatografía de Bio-Bead.
- 4º Paso: Después de la cromatografía de Lipidex.
- 5º Paso: Después de la cromatografía de Afinidad.

2.5.2 Rendimiento en los pasos de la purificación.

La concentración de proteínas fue determinada en todos los casos mediante los métodos de Leslie Hudson (1989), y Bradford, M. (1976), que se describen a continuación.

Método de Leslie Hudson: Este es un método, que se podría llamar directo, puesto que la concentración de proteínas se calcula midiendo la longitud de onda de las distintas diluciones proteicas tanto a 260 nm como a 280 nm, y aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{PROTEÍNAS}] = [155 A_{280} - 0,77 A_{260}]$$

En donde:

A_{280} : valor de absorbancia a 280nm.

A_{260} : valor de absorbancia a 260nm.

Método de Bradford: Este es un método, en donde se utiliza un reactivo para realizar las mediciones, que en este caso es el de la marca comercial BIO-RAD (Bio-Rad protein assay kit II. Bio-Rad), donde como solución patrón se utiliza una solución de albúmina bovina (BSA) a una concentración 0.1 µg/ml. Este método está fundamentado en los cambios de absorbancia producidos a 595nm, dependiendo de la cantidad de proteínas existentes en las soluciones a analizar.

Procedimiento para la determinación de proteínas a través del método Bradford.

Como muestra patrón: Albúmina bovina (de SIGMA).

Como reactivo de Bradford: El de la marca comercial Bio-Rad (de Bio-Rad protein assay kit II. Bio-Rad).

Para determinar la concentración de las proteínas por el método de Bradford se siguió el siguiente procedimiento: Se mide el volumen de la solución conteniendo la muestra de proteínas y se completa con agua destilada, PBS o buffer carbonato, si fuera necesario, hasta un volumen de 1 ml. A continuación se le añade 1ml del Reactivo de Bradford, se agita y se deja reposar durante 10 min a temperatura ambiente, tras los cuales se mide la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm en un Espectrofotómetro de Mitton Roy (Spectronic 3000), utilizando como blanco 1 ml de agua destilada mezclada con 1 ml de Reactivo de Bradford.

La curva patrón se obtiene realizando este mismo procedimiento, solo que utilizando una disolución de albúmina bovina (BSA) de 1mg /ml de la que se toman valores de 2 a 32 µl, y como blanco 2 ml de agua destilada.

La capacidad que tienen las proteínas FABP de ligar los ácidos grasos después de los distintos pasos del proceso de purificación, se determinó de acuerdo con Hasan y col., 2005, obteniéndose así la actividad durante todo el proceso.

La actividad de unión de las proteínas hacia los ácidos grasos, usando el DAUDA, se determinó siguiendo el método descrito por Thumser y col. (1999), para lo cual, se procedió a preparar una solución 0,1 mM de DAUDA, por adición de 9 volúmenes de tampón fosfato 50 mM (pH 7,2) a una solución stock de 1mM de DAUDA (ácido undecanoico dansyl, Molecular Probes), en metanol.

La λ excitación máxima, λ emisión (nm) y la intensidad máxima de fluorescencia (FI), se determinó adicionando pequeños incrementos de

proteína purificada desde 0,1 μg a 3 μg , en una cubeta conteniendo 1ml de la solución 1 μM de DAUDA, hasta la observación de cambios en la λ emisión (Ex 330 nm, Em 330 a 600 nm), λ excitación (Ex 250 a 400 nm, Em 500 nm).

Para la detección del máximo de unión del DAUDA a la proteína, se adicionaron alícuotas de 2 μl de DAUDA (0,1 μM hasta 1 μM) a la cubeta conteniendo 2 ml de proteína purificada disuelta en tampón fosfato (50 mM a pH 7,2), seguidamente se le dejó estabilizar durante 30 s (Wilton 1990) hasta su medición en el espectrofotómetro de fluorescencia F-2000 Hitachi.

La intensidad de fluorescencia de unión no específica, se evaluó adicionando las mismas cantidades de DAUDA al tampón sin la proteína, y al tampón conteniendo un exceso de proteínas (40 μg).

2.6 Técnicas de Electroforesis.

2.6.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS.

El SDS-PAGE es la técnica de electroforesis más usada para el análisis de proteínas (Laemmli 1970; Andrews 1986), y se debe al pretratamiento y la capacidad que tiene el detergente aniónico SDS (Dodecil Sulfato Sódico) para unirse a las proteínas, confiriéndoles una carga neta negativa, que permite realizar la separación exclusivamente en función de su Masa Molecular Relativa (Wyckoff y col., 1977). Otra de las características es la presencia opcional del β -mercaptoetanol en el tampón de muestra, y su capacidad de disgregar los puentes disulfuro, liberando así las diferentes subunidades.

2.6.1.1 Los Geles de Poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida están formados por la polimerización de monómeros de acrilamida, junto con monómeros del agente de entrecruzamiento (agente bifuncional). El mejor agente bifuncional y el más usado es la N.N-metilen-bis-acrilamida.

Estos geles, se forman a través de la vinilpolimerización, constituyendo una red tridimensional.

La concentración de acrilamida y la concentración del agente bifuncional, son parámetros importantes para determinar las propiedades físicas del gel. Estas propiedades son el tamaño de poro, la elasticidad, la densidad y la fuerza mecánica. Otra propiedad importante de estos geles, es que además

son transparentes, consiguiendo así una mejor visualización de los componentes separados en la electroforesis (Dunn, 1993).

La composición del gel está definida por dos parámetros, como son %T y %C donde:

- % T: Acrilamida monomérica + agente entrecruzador % (w/v).
- % C: Porcentaje (en peso) del monómero de agente entrecruzador.

Para realizar la electroforesis, se ha usado el Phast System de Pharmacia junto con geles de Poliacrilamida al 12,5% (Phast Gel Homogeneous 12,5), y del 20% (Phast Gel Homogeneous 20), en tampón conteniendo 0.112M de acetato y 0.112M de Tris a pH 6.5, con el que se crean condiciones desnaturalizantes que ayuden a la electroforesis.

La parte separadora del gel posee una longitud de 32 mm, mientras que la parte almacenadora posee una longitud de 13 mm, con 45 mm de anchura. Se utilizaron pastillas de agarosa Phast Gel SDS Buffer Strips amersham Pharmacia Biotech AB, que contienen embebido el tampón de corrido de la electroforesis.

Proteínas marcadoras.

Como proteínas marcadoras se utilizó una mezcla de proteínas de peso molecular medio, obtenida comercialmente (Amersham), en donde los pesos moleculares oscilan entre 14000 y 200000 kDa.

Lisozima.....	14400 kDa.
Inhibidor sérico de Tripsina.....	21500 kDa.
Anhidrasa carbónica.....	31000 kDa.
Ovolbúmina.....	42699 kDa.
Albúmina bovina.....	66200 kDa.
Fosforilasa B.....	97400 kDa.
β-galactosidasa.....	116250 kDa.
Miosina.....	200000 kDa.

2.6.1.2 La preparación de las muestras.

Una vez que las muestras han sido obtenidas, estas son diluidas (1:1), en tampón de la muestra y calentadas durante 5 min a 96 °C .

El tampón de muestra utilizado fue el de Laemmli (1970), junto con algunas modificaciones, como su contenido en SDS, para que este no sea necesario de añadir al gel, y que está compuesto por:

Tris/HCl a pH 8 10 mM.
EDTA 1 mM.
SDS al 2.5%.
Glicerina al 17% para aumentar la densidad de la muestra.
Azul de Bromofenol al 0.01% para visualizar su migración en el gel.
 β -mercaptoetanol.....2.5 %.

En algunos experimentos, el β -mercaptoetanol no fue utilizado en el tampón de muestra, por lo que las electroforesis fueron consideradas como no desnaturalizantes.

Después de añadir el tampón y calentar la muestra, esta se centrifuga para eliminar de ella todo el material insoluble.

La aplicación de las muestras al gel se realizó con ayuda de un aplicador (PhastGel Sample Appl. 8/1, Pharmacia), y la separación fue realizada en las siguientes condiciones, que se programan en la unidad de control del equipo PhastSystem[®]:

<u>Pasos</u>	<u>Voltaje</u>	<u>Amperaje</u>	<u>Potencia</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Voltios 1h</u>
Paso 1	250 V	10.0 mA	3.0 W	15 °C	1 Vh
Paso 2	250 V	1.0 mA	3.0 W	15 °C	1 Vh
Paso 3	250 V	10.0 mA	3.0 W	15 °C	70 Vh

Una vez realizada la electroforesis, se procedió a la tinción de los geles.

2.6.1.3 Tinción de los geles.

Tinción con Azul Coomassie;

Posee una sensibilidad aproximada de 20 a 30 ng de proteína por banda (Wilson, 1979).

Para ello se prepara una solución al 0.1% de Phast Gel Blue R, en una solución de agua destilada conteniendo metanol al 30% y ácido acético al 10%. El gel se mantiene sumergido en ella durante unos 10 min.

Una vez teñido el gel, y a fin de diferenciar las bandas proteicas contenidas en él, este fue desteñido en una solución de agua destilada, metanol al 30% y ácido acético al 10% hasta la visualización clara de las bandas. Esta solución puede ser filtrada y reutilizada varias veces.

La transparentación de los geles fue realizada en una solución de Glicerina al 5%, si el Phast Gel Homogeneous es del 12.5%, y Glicerina al 10%, si el Phast Gel Homogeneous es del 20%. En ambos casos, la Glicerina va diluida en agua destilada conteniendo ácido acético al 10%. Esta solución se mantiene en contacto con el gel durante unos 15 min.

Todo el proceso de teñido y desteñido fue realizado a la temperatura de 45°C.

Tinción con Nitrato de plata.

Es un método de tinción de elevada sensibilidad, del orden de 0.3 a 0.5 ng de proteína, en los geles de electroforesis SDS-PAGE (Heukeshoven y col., 1985).

Todas las soluciones para esta tinción, han de estar preparadas y mantenidas en un baño a la temperatura de 50°C, siendo recomendable que las reacciones se realicen en constante agitación. Para ello, primero se sumerge el gel para su fijación, en una solución que contiene Etanol al 50%, Acético al 10% y agua al 40%, durante 2 min, y una solución formada por glutaraldéhidido al 33% y agua al 67%, donde se mantiene durante 6 min. Realizada la fijación, el gel se lava dos veces por inmersión de 2 min cada una, con agua destilada. Una vez terminados los lavados, se introduce en la solución de tinción formada por 0.25 g de NO_3Ag en 100 ml de agua. El tratamiento con esta solución se realiza en oscuridad durante 13 min, enjuagándose posteriormente el gel repetidas veces con agua destilada durante 0.5 min. Terminados los lavados, se revela el gel

con el revelador (en 100 ml de agua destilada, 2.5 g Na₂CO₃ y 40 µl de formaldehído), durante 4 min.

El revelado se detiene añadiendo al gel una solución que contiene agua al 95% y ácido acético al 5%, durante 2 min. La conservación se efectúa tras sumergirlo en una solución que contiene agua al 85%, Ácido acético al 10% y Glicerol al 5%, durante 3 min.

2.7 Transferencia de Proteínas.

La técnica de electro transferencia fue descrita por Towbin y col., en 1979.

2.7.1 Los materiales y reactivos.

Para la transferencia, se emplearon membranas de Nitrocelulosa, las cuales poseen una alta capacidad de ligar a las proteínas (249 µg/cm²), de forma no covalente, mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Lauriere, 1993). La membrana de Nitrocelulosa utilizada fue Hybond[®] - C Extra, (Amersham).

Para su preparación, las membranas fueron sumergidas durante 5 min en Metanol, y posteriormente fueron impregnadas en tampón de transferencia, el cual fue descrito por Towbin y col. (1979), y que está compuesto por:

Tris-HCl pH 8.3	25 mM.
Glicina	192 mM.
Metanol	20 %.

Para realizar el proceso de transferencia de las proteínas, se utilizó el equipo de transferencia PHAST Transfer Semi-dry Transfer Kit, de Pharmacia, con el que primero se separa el gel de su soporte de plástico, y mediante la aplicación de una carga eléctrica se transfieren las proteínas desde este gel de Poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa.

Una vez que termina la transferencia, se toma la membrana de nitrocelulosa, y al objeto de comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñe con Rojo Ponceau (Salinovich y Montelaro, 1986). Para ello, las membranas ya transferidas fueron sumergidas en el colorante, el cual está ya disuelto al 0.2 % en una solución de agua destilada que contiene Ácido Tricloroacético al 3 %. Esta solución se mantiene en contacto con el gel durante unos 10 min.

El desteñido fue realizado por sucesivos lavados en agua destilada, y la visualización de las bandas evidenció el resultado positivo de la transferencia.

Muestras de proteínas transferidas de igual modo a membranas de PVDF, fueron enviadas para su secuenciación al laboratorio de Química de Proteínas IBCP (IBCP, INSERN, Lyon Francia).

2.8 Fragmentación en péptidos de las proteínas.

Puesto que se pudo comprobar, mediante los resultados proporcionados por el laboratorio anteriormente mencionado, que esta proteína posee el extremo N-terminal bloqueado, se procedió por tanto a conocer los posibles puntos de ruptura que posee la mencionada proteína, utilizando algunas enzimas proteolíticas.

A fin de conocer su inmunogenicidad y facilitar su secuenciación, se trataron las proteínas cromatografiadas y purificadas, con dos enzimas proteolíticas. Para ello, se decidió utilizar tripsina (tripsina inmovilizada con agarosa de PIERCE) y papaína (papaína inmovilizada con agarosa de SIGMA), que tienen entre sus dianas de corte a los aminoácidos Lisina y Fenilalanina respectivamente. Tras lavar varias veces los dos enzimas inmovilizados con PBS estéril, 200 µg de la proteína purificada fueron diluidos en 4 ml de PBS o de solución de Hank respectivamente, repartiéndose estos a razón de 2 ml por cada una de las enzimas a utilizar, en una proporción de 20/1. Ambos tratamientos son incubados durante 1 hora, a 37°C, con suave agitación, de acuerdo con la bibliografía consultada (Roberts y col., 1977; Yarnall y Boyle 1986). Terminado el tiempo de incubación, los enzimas inmovilizados son retirados mediante centrifugación a 1000 g, separando los enzimas de los fragmentos ya cortados. Estos fragmentos son dializados posteriormente mediante su inclusión en membranas de diálisis Spectra/Por[®] 3 Spectrum laboratorios, de un tamaño de exclusión de 3.500 kDa, enfrentándolas con agua destilada, durante 48 horas, cambiando el agua cada tres horas. Las proteínas tratadas con ambos enzimas, fueron precipitadas y liofilizadas, siendo disueltas en tampón de muestra para su posterior análisis electroforético, estudiando los resultados obtenidos para su posible secuenciación.

Los enzimas son recuperados mediante su lavado durante 3 veces consecutivas en PBS, y su posterior centrifugación a 1000 g, almacenándose ambos a 4°C, en PBS conteniendo Azida Sódica al 0.02 %.

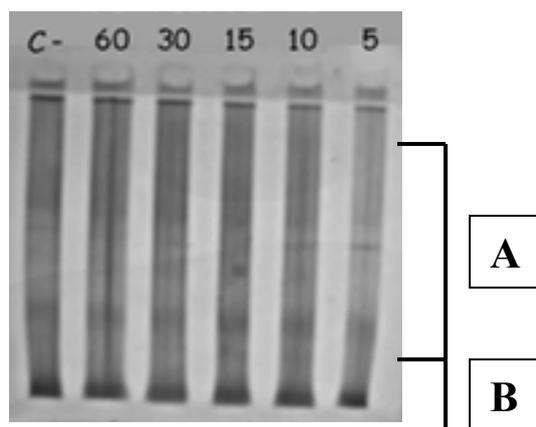
2.9 Capacidad de desplazamiento del ácido oleico radiactivo.

A fin de comprobar la afinidad de las proteínas FABP purificadas, para sustancias tales como Taurocolato, Glycocolato, Deoxycolato, y ácidos grasos tales como Ácido Palmítico y Ácido Araquidónico, se realizó un experimento en donde una vez que las proteínas han ligado al ácido oleico [$^{14}\text{C}(\text{U})$] NENTM (ARM, American Radiolabeled Chemicals, Inc, St Louis, Missouri), estas son enfrentadas en función del tiempo, a concentraciones 100 veces mayores de los compuestos anteriormente mencionados, estudiándose de esta forma la radioactividad desplazada como consecuencia del desplazamiento del ácido oleico, proporcionando información sobre la afinidad de dicha proteína para con estos compuestos (Catala 1984 y 1985; Maatman y col., 1994 a y b). Para ello, una dilución de las proteínas purificadas a la concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se incubaba durante 60 min con 0.1 μCi de ácido oleico radiactivo (Campbell y col., 1994), a 28 °C, dividiéndose en partes iguales para ser incubadas con los diferentes compuestos en los que se va estudiar la capacidad que poseen de desplazar al ácido oleico. Tras terminar el tiempo de incubación de las proteínas purificadas con el oleico radiactivo, los compuestos fueron incubados posteriormente a 37 °C, con Lipidex, al objeto de captar el ácido oleico no ligado. Una vez que las proteínas se encontraron ligadas al oleico, estas fueron incubadas con la concentración 100 x de los compuestos anteriormente mencionados.

Las alícuotas de cada una de las incubaciones, fueron obtenidas a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min), deteniendo la reacción en cada caso al ser colocadas en hielo, y posteriormente incubándose nuevamente con Lipidex para eliminar el posible ácido oleico desplazado, eliminándose a continuación por centrifugación del Lipidex utilizado.

Por último, se realiza una electroforesis de cada una de las alícuotas extraídas, utilizando geles de Poliacrilamida al 12,5% (Phast Gel Homogeneous 12,5). Tras las electroforesis, se extraen de cada uno de los carriles obtenidos las proteínas que han corrido a través del gel, separándolas del ácido oleico radiactivo libre que aún pudiera quedar no ligado a ellas, por lo que se recorta cada carril por separado, y cada uno de ellos es recortado a su vez en dos fragmentos bien diferenciados **A** y **B** (Fig. 8): Un primer fragmento que llevará consigo la banda que aparece justo al final de cada carril (**B**), y otro segundo fragmento que llevará consigo la banda gruesa que aparece con un peso molecular mayor, junto con el fragmento de carril que se encuentra por encima de esta (**A**).

FIGURA: 8.



2.9.1 Extracción de proteínas de un gel de poliacrilamida para la realización de mediciones de centelleo.

Se Rotulan 60 viales para medición de centelleo, de modo que cada uno de ellos identifique uno de los fragmentos en los que se ha recortado cada uno de los carriles obtenidos en los geles. Se añade a cada vial 0.2 ml de ácido perclórico al 60%, y se agitan suavemente para que los pequeños fragmentos del gel se empapen bien con esta solución. Se añade también 0.4 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, y se agitan de nuevo para que se vuelva a mezcle todo correctamente. Una vez cerrados los viales, estos se incuban en un baño a 70-80 °C durante 30-60 min, junto con una suave agitación, y tras la incubación y una vez que se han enfriado hasta alcanzar temperatura ambiente, se les añade a cada uno de los viales 7 ml de líquido de centelleo (Ecolite. ICB. Costa Mesa. California), que es mezclado por una suave agitación.

La composición del líquido de centelleo empleado fue: Alkylbenzene, Phenyxylyethane, Non-Ionic Surfactants, 2,5-Diphenloxazole, p-Bis(o-methylstyryl)Benzene.

La radioactividad existente en las proteínas fue medida en un contador de Centelleo β (Beckman, Palo Alto, California).

Con los DPM obtenidos se calculó las constantes de asociación ($K+1$) y de disociación ($K-1$), cuyo cociente $(K-1)/(K+1)$ nos proporciona la constante de afinidad K_D . En función de la cinética de Scatchard, estos cálculos se hicieron mediante el programa LIGAND-PC (Biosorf, Cambridge, U.K.).

2.10 Determinación del peso molecular mediante espectrometría de Maldi-tof.

Una vez determinada la concentración de proteínas del último paso de la purificación, se analiza mediante espectrometría de masas el peso molecular exacto de la proteína purificada. Para ello, se utiliza un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) BRUKER mod. AUTOFLEX, de rango de medida de hasta 500000 uma, existente en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, el cual nos proporcionó el peso molecular de las proteínas FABP, purificadas de *Giardia*.

2.11 3' RACE de la FABP de *Giardia lamblia*.

Como se pudo comprobar por las investigaciones realizadas anteriormente sobre las “Proteínas Capaces de Ligar Ácidos Grasos” (FABP) de *Giardia lamblia*, su secuenciación es realmente difícil por la multitud de problemas que presentan, tales como la estructura en forma de bucle que adoptan, el bloqueo en su extremo N-terminal, y la capacidad de formar complejos cuando la proteína está fragmentada o está como forma apo, dado que se forman agregados de mayor peso molecular, impidiendo igualmente su secuenciación. De este modo, se optó por buscar caminos alternativos para lograr la secuenciación del gen, y conocer así la proteína, tales como clonar o aislar el gen de interés, ayudándonos de diversas estrategias.

La primera de ellas consistió en la amplificación del gen que codifica la proteína FABP, mediante PCR, a partir del DNA genómico procedente de este parásito (Sambrook y col., 1989), utilizando para ello dos cebadores, diseñados a partir de la secuencia consenso con otras especies.

La secuencia consenso, fue realizada de los siguientes organismos *Schistosoma*, *Fasciola*, *Echinococcus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Caenorhabditis elegans* y *Homo sapiens*, comparando en primer lugar las secuencias de las proteínas con función similar, existente en especies parásitas, y que al menos teóricamente se encontrarían “evolutivamente” más próximas a *Giardia*, como son *Schistosoma*, *Fasciola*, *Echinococcus*, con especies más recientes como puede ser *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Caenorhabditis elegans*, y el propio *Homo sapiens*.

Para encontrar en las diferentes especies analizadas tanto las secuencias en aminoácidos de las proteínas, como las secuencias de nucleótidos del DNA que las codifica, se utilizan las bases de datos Swiss-Prot y EMBL, mientras que para realizar su alineamiento, localizando así las zonas más conservadas de estas secuencias, nos ayudamos del programa ClustalX.

Una vez localizadas las zonas de las secuencias más conservadas, se utiliza el programa Eprimer3 del paquete EMBOSS (Rice y Col., 2000; Steve Rozen y Helen J. Skaletsky, 1996, 1997, 1998), con el que decidimos las zonas más favorables, y el diseño de los dos cebadores específicos necesarios para la amplificación del gen por PCR, gracias a los parámetros que proporciona este programa.

Habida cuenta de la baja conservación de este gen entre las especies comparadas, como se verá en el apartado de resultados, se abordó una segunda estrategia que consistió en el diseño de una reacción 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) mediante la utilización de un cebador específico de las FABP diseñado a partir de una región conservada del gen, y otro inespecífico, unido covalentemente a una cola de oligo-T, que sirviera para la realización de la reacción de retrotranscripción, seguida de una amplificación por PCR con ambos cebadores. En detalle el diseño de la estrategia consistió en lo siguiente:

- Se utilizó como cebador específico el oligonucleótido:

5' CGTGGAAGMTKGGCGAATC 3'

Al que llamaremos a partir de ahora **FABP-G-F** (FABP *Giardia* "Forward"), y que fue diseñado según la secuencia consenso (ver Resultados, página 108), y donde **M**: indica **A** o **C**, y **K**: indica **G** o **T**.

- Como cebador de la reacción de retrotranscripción se diseñó el oligonucleótido:

5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN 3'

Al que denominaremos a partir de ahora **oligoT-3'RACE**.

La cola de 20 T cebaría la reacción de retrotranscripción. Los dos nucleótidos en el extremo 3' son V (A, G o C) y N (A, G, C, T) y se incluyen para que el oligonucleótido tenga que hibridar con el comienzo de la cola de poly-A del mRNA. Los 25 nucleótidos en 5' quedarían sin aparear en la reacción de retrotranscripción, pero posteriormente servirían para amplificar la FABP junto con el cebador FABP-G-F.

Una alícuota del cDNA de hebra simple procedente de la retrotranscripción, se utilizó como DNA molde para la amplificación por PCR de un fragmento de la FABP, utilizando como cebadores el

FABP-G-F y un oligonucleótido consistente en los 25 primeros nucleótidos del extremo 5' del oligoT-3'RACE:

- Cebador para la amplificación por PCR de la retrotranscripción:

5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC 3'

Al que denominaremos a partir de ahora **3'RACE-R** ("Reverse").

El procedimiento completo se esquematiza en la figura 9, y se llevó a acabo siguiendo el siguiente protocolo de la marca comercial Invitrogen[®] llamado ThermoScript[®] RT-PCR System.

1° Retrotranscripción:

En un eppendorf de 200 µl para PCR se mezclan los siguientes componentes.

- OligoT-3'RACE (50 µM)..... 1 µl.
- RNA Total (0,6 µg/µl)..... 7 µl.
- dNTPs Mix (10 mM)..... 4 µl.

Incubamos a 65°C durante 6 min.

Enfriamos a 4°C.

Añadimos al eppendorf la siguiente mezcla previamente preparada.

- H₂O tratada con DEPC.....1 µl.
- Buffer 5X.....4 µl.
- DTT (0,1 M).....1 µl.
- RNasaOUT[®] (40 U/µl).....1 µl.
- ThermoScript[®] RT (15 U/µl).....1 µl.

Incubamos a 55°C durante 45 min.

Incubamos a 85°C durante 5 min.

Añadimos a la mezcla anterior.

- RNasa H (2 U/µl).....1 µl.

Incubamos a 37°C durante 20 min.

Almacenamos a -20°C.

2° Amplificación por PCR:

En un eppendorf de 200 μ l para PCR se mezclan los siguientes componentes, hasta un volumen final de 50 μ l.

- H₂O..... 38,1 μ l.
- FABP-G-F (10 μ M)..... 1 μ l.
- 3'RACE-R (10 μ M)..... 1 μ l.
- dNTPs Mix (10 mM)..... 1 μ l.
- Buffer 10X (Sin Cl₂Mg)..... 5 μ l.
- Cl₂Mg (50 mM)..... 1,5 μ l.
- Platinum[®] *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μ l).... 0.4 μ l.
- cDNA sintetizado en la retrotranscripción..... 2 μ l.

Mezclamos suavemente los componentes, y colocamos posteriormente la reacción en el interior del termociclador, que es programado del siguiente modo:

PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO
Precalentamiento	94 °C	2 Min.
30 Ciclos	94 °C	1 Min.
	46 °C	1 Min.
	72 °C	1 Min.
Extensión final	72 °C	5 Min.
Almacenamiento	4 °C	∞

El resultado obtenido, es posteriormente analizado mediante la visualización de una alícuota de 7 μ l, en un gel de agarosa al 2%, en tampón TAE (0.04 M de Tris-acetato a pH 8 y 0.001 M de EDTA), conteniendo EtBr (Bromuro de etidio).

Como control positivo para la comprobación de la eficiencia tanto de los cDNA creados como de los DNA extraídos de los cultivos de trofozoítos de *Giardia*, creamos mediante el programa Eprimer3 del paquete EMBOSS (Rice P. y Col., 2000; Steve Rozen y Helen J. Skaletsky, 1996, 1997, 1998), dos cebadores específicos de un gen constitutivo del metabolismo de *Giardia* como es el gen de la Glucosa 6-Fosfato Isomerasa (AF050754).

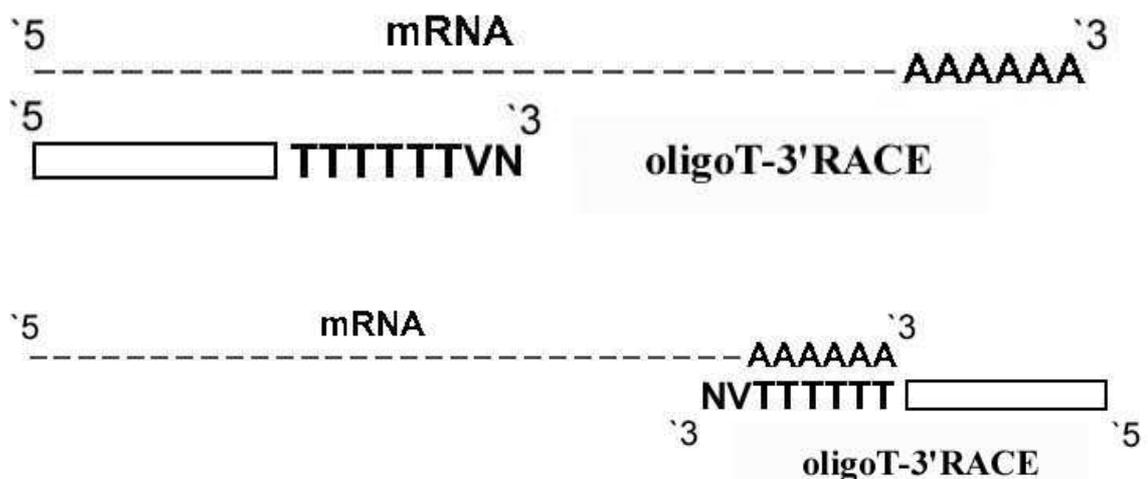
A continuación se puede observar la secuencia completa del gen de la proteína Glucosa 6-Fosfato Isomerasa (AF050754), en donde se muestra tanto la localización de los dos cebadores diseñados de este gen, como el tamaño de la secuencia que codifican.

```

TTAATTGGTT GCTCTTGGGT CGCAGCAGCG CAGGTGGAGA GGAGTTCGCA
CCAGCTGGAG CTATGTCCAG GGTACAACCTT GTTTCTGACA GCTGTATGTG
GTGGTGGGGC GCTCTTTCTC TTGTGCCTCT CACCGACAGC ATCTATTGGG
CTAGCTGTGA GCTTTGCTTC GTGGATGTTT GCCAACATTG CAGTAATACG
CTCTGCTATA TCTACATTTT GCGCGGAGAG CAGACTGCGA GTCAGCAATC
AACTCGGCTA CATTATCGGA CCATCATGTT TCATTAAAAT TTCGCCGAGG
GGCTCCACGT GTACGATCGG CGCACGCCCC AGCCTGTGGG ACTTGTTGTA
GACGTATACT GCGTACGGAA CTCCTGTAAG GGTTTACTAC AGCAGTAGCA
GTATATATGT AACTGCCTCG CCAAAAATAAA AATGCCGTCC ATCCACGTCT
      5' AAATAAA AATGCCGTCC ATCC 3'
CCAAATGCGC TGATCCAGCC ATAAAGCTTG CCCACCGTAT CGCGGAAGTI
GTCCGCAGCA AGCCGAATTG CGTTCTGGGC CTGGCGACCG GATCGACCCC
CATCCCCGTC TACCAGGAGC TTGCCCGTCT CCACCGCGAG GAAGGCCTAG
ACTTCTCGCA GGTCAGGACT TTCAACCTGG ACGAGTATGC AGGGCTCCCT
5' AGAGCGT CCAGTCCTGA AA 3'
CCCACGCACG ACCAGACGTA CCGCTTCTTC ATGGAGGAGC ACCTCTTCAG
CAAGGTCAAT ATAAAGCCGG AGAATGTACA CTTCTCAAT GGAATGGCTT
CGGACTACGA AAAGGAGTGC GAGCGCTATG AGCAGGAGCT CAAGGCGATT
GGCCCCTGCG ATGTCTGGCT TCTGGGGATC GGGCACAACG GTCACATCGC
CTTCAACGAG CCGGGGTCCC CGAGAGACAG CAGGACGCGC GTCGTCTGCC
TGACCCAGAG CACGATCGAC GCCAACGCGC GCTTCTTCGG AAACGACAAG
TCGAAGGTCC CGACCAAGGC CCTCTCTGTG GGGATAGCAA CCATCATGGA
GAGCCGCGAG ATCCTCCTTC TCGCCACCGG TGAGAGCAAG CGCGAGGCTG
TTACTAAGAG TGTTAAAGGA AAGTGCGAGA CCCATTGCCG GGCCTCCTTC
CTCCATGAAC ATCCTCACTG TCGTTTCTAT GTCGACATGG ATGCAGGCAA
GGTGGTGGAT AACACTTGTT GCCAAGCTAC AAACCAAGCA AGCTGCTGCG
GCTCCACTTC CTGTCACGCT GCAAAAGCTT AAACACGTGA ATGGATGCCA
ATAAGTGAAT ATCTGTCCAT GTCATCTTCA AACCAAGCAA GCGTGGAAct
CTGCAG

```

FIGURA 9.



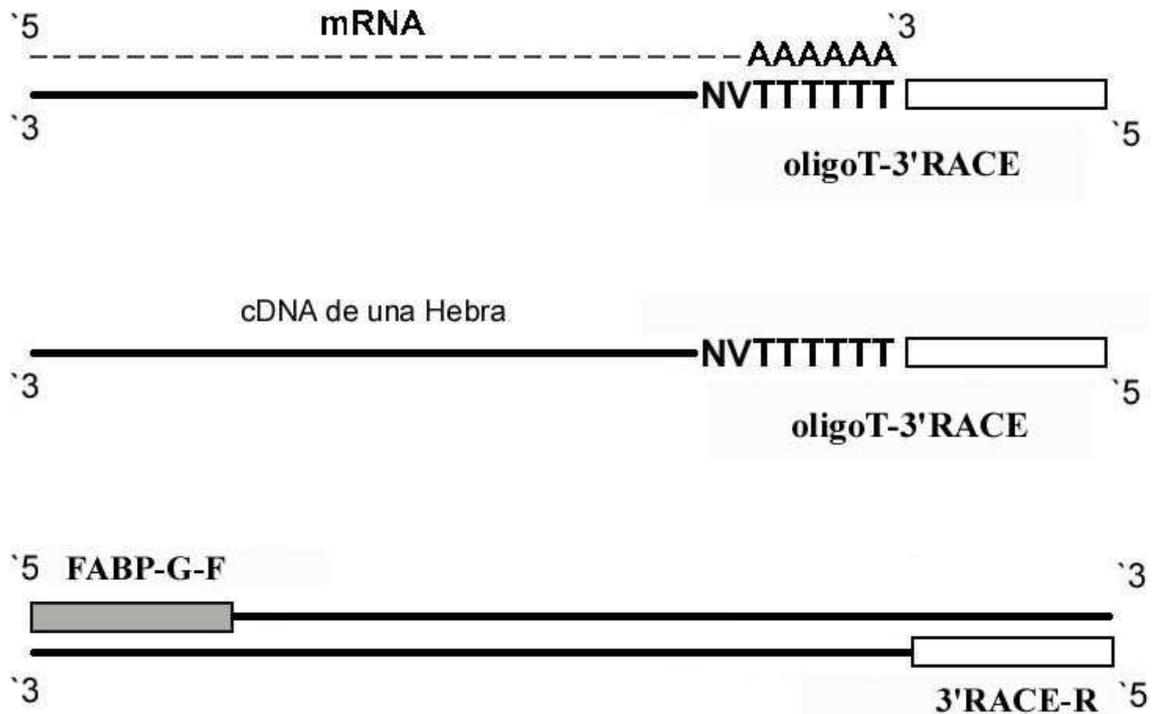


Fig.9: Esquema del proceso completo de la reacción 3' RACE de la FABP de *Giardia lamblia*.

2.12 Genoteca de expresión.

Una tercera estrategia consistió en la realización de una genoteca de expresión de *Giardia lamblia* en la que se pudiesen rastrear los diferentes antígenos expresados por este parásito, mediante la utilización de una técnica de inmunorastreo.

En la construcción de la genoteca se siguieron los pasos que se describen en los siguientes apartados.

2.12.1 Eliminación de RNasas del material a utilizar.

Para evitar la degradación del mRNA, es necesario eliminar cualquier traza de RNasas en el material de vidrio y plástico que vaya a estar en contacto con las muestras. Para ello, es necesario tratar todo el material con productos que inactiven las RNasas. Uno de los más utilizados es el DMPC (Dimethyl pirocarbonato), que siendo igual de efectivo que el DEPC (Diethyl pirocarbonato), es sin embargo menos tóxico.

Para el tratamiento con el DMPC, se prepara una solución de agua ultra pura estéril con DMPC al 0.1 %, y se sumerge en ella todo el material que se vaya a utilizar para el manejo de los RNA, tales como puntas, eppendorf,

viales y frascos de vidrio, durante 2 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, el material se autoclava a 121°C y 1,2 atmósferas de presión, durante 30 min. La solución de DMPC que se ha utilizado en el tratamiento también se autoclava en las mismas condiciones, con objeto de inactivar el DMPC, tras lo cual puede desecharse sin daño para el medio ambiente. Una vez seco, el material queda listo para su utilización.

2.12.2 Obtención de los mRNA de *Giardia lamblia*.

Una vez preparado el material, deben de iniciarse los cultivos de *Giardia lamblia*, necesarios para la obtención de las muestras de mRNA, de forma que se disponga de ellos en el momento en que vaya a realizar la extracción, con objeto de evitar la degradación del mRNA por el almacenamiento de las muestras durante cierto período de tiempo. Aunque la degradación fuese parcial, esta redundaría en mRNA fragmentados que disminuirían tanto el rendimiento de la extracción como el tamaño de los fragmentos que se pudieran clonar. Además, puesto que la retrotranscripción se realiza partiendo del extremo 3' del mRNA, la degradación parcial de éste disminuye considerablemente la probabilidad de obtener secuencias más próximas al extremo 5'.

Otro factor favorable a tener en cuenta, es la adición al medio de cultivo de 30 µl/100 ml de ácido butírico, puesto que se conoce que la adición extra de ácidos grasos a cultivos celulares induce la expresión de una mayor cantidad de proteínas capaces de intervenir en el metabolismo de estos ácidos grasos, que posiblemente se traduzca en un incremento de los mRNA que codifican para estas proteínas, entre las que se encuentran las FABP (Alpers y col., 2000; Dube y col., 2001; Trevaskis y col., 2006).

72 horas después de su siembra, los trofozoítos cultivados a 37°C, en medio TYI-S 33, enriquecido con un 10% de suero fetal bovino y con el suplemento de ácido butírico, se encuentran en fase exponencial de crecimiento. Se centrifugan, y el sedimento obtenido, de alrededor de 0.5 ml, es resuspendido y lavado varias veces con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo que puedan quedar entre las células. Una vez que el sedimento está totalmente limpio, se le añade 4 µl de RNasa OUT[®] Ribonuclease inhibitor (40 U/ µl), para que se minimice en lo posible la actuación de las RNasa propias de las células (Klebe y col., 1996), y se almacena en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

La extracción de los mRNA está basada en la utilización el kit Micro-FastTrack 2.0 Kit, de la marca comercial Invitrogen. Este kit basa su eficacia en la unión de las colas de poly-A de los mRNAs, a unas colas

poly T unidas previamente a una matriz de celulosa inerte denominada celulosa oligo(dT).

- Una vez el sedimento es lavado varias veces con PBS a 4 °C, a fin de eliminar los restos de cultivo, se le añade tampón de lisis, calentando previamente el tampón stock a 65 °C hasta que se disuelva el SDS.
- Se enfría a temperatura ambiente, y se le añade 20 µl de la solución para degradar proteínas y RNAsas, por cada 1ml del tampón stock utilizado.
- Se transfieren las células a un eppendorf estéril, añadiéndoles 1ml del tampón de lisis que se acaba de preparar, y se voltea la mezcla hasta resuspender el homogenado.
- Tras resuspender, el homogenado es pasado varias veces a través de una jeringuilla de plástico de 1cc estéril, para romper bien las membranas celulares, repitiendo el proceso hasta que este pierda totalmente la viscosidad que posee.
- Una vez que los trofozoítos de *Giardia* se encuentran lisados, el homogenado resultante es incubado en un baño a 45°C durante 15-20 min.
- Si transcurrido este tiempo aun persiste el material insoluble, se centrifuga el homogenado a 4000 g durante 5 min a temperatura ambiente, transfiriéndose el sobrenadante a un nuevo eppendorf.
- Al sobrenadante obtenido, se le ajusta la concentración de NaCl hasta una concentración final de 0.5 M, utilizando una concentración stock de NaCl 5 M.
- Al objeto de disgregar los restos de ácidos nucleicos que pueden formar grumos, el homogenado es pasado a través de una aguja hipodérmica.
- Cuando no queden restos de grumos, el sobrenadante es transferido a un vial conteniendo la celulosa oligo(dT), dejando que la celulosa se humedezca bien durante 2 min aproximadamente.
- Tras estar bien humedecida, se agita durante 1 hora a fin de que toda la celulosa se mezcle con el homogenado, centrifugándose a 4000 g durante 5 min, recogiendo el sobrenadante con cuidado de no arrastrar la celulosa.
- Eliminado el sobrenadante, resuspendemos suavemente la celulosa oligo(dT) almacenada en el fondo del vial con 1.3 ml del tampón de lavado y se centrifuga nuevamente a 4000 g durante 5 min a temperatura ambiente, eliminando el tampón de lavado.
- Repetimos este paso hasta que el tampón no salga turbio, y resuspendemos la celulosa oligo(dT) en 0.3 ml de tampón de lavado.

- Transferimos el conjunto a una spin-column, que es una columna de filtrado que colocamos sobre un nuevo eppendorf, y centrifugamos a 4000 g, durante 10 s, a temperatura ambiente.
- Tras la centrifugación, es eliminado el eppendorf que acompaña a la spin-column, junto con el contenido de este, siendo sustituido por un nuevo eppendorf.
- Añadimos una nueva alícuota de 500 μ l del tampón de lavado sobre la spin-column y repetimos el proceso hasta que la lectura de la densidad óptica a 260 nm sea < 0.05 .
- Cuando se alcanza la lectura de densidad óptica anteriormente definida, se añaden 200 μ l de tampón de lavado bajo en sales, resuspendiéndose la celulosa por ligeros pipeteos, y centrifugando repetidas veces a 4000 g durante 10 s. Este último proceso, tiene por objeto eliminar los restos de SDS así como los rRNA que pudieran quedar.
- Terminados los lavados, el proceso de elución comienza colocando la spin-column sobre un nuevo eppendorf, y añadiendo sobre esta 100 μ l de tampón de elución que es mezclado con la celulosa por suave pipeteo.
- Centrifugamos a 4000 g, durante 10 s, a temperatura ambiente, obteniéndose el tampón añadido, conteniendo los mRNA. El proceso se repite una segunda vez al objeto de obtener los mRNA que hubiesen aun quedado en la columna.
- Para conseguir la precipitación de todos los mRNA, a los 200 μ l del tampón de elución obtenidos, se les añaden 10 μ l de una solución de 2 mg/ml de glucógeno, 30 μ l de 2M de acetato sódico y 600 μ l de Etanol al 100%.
- Una vez agitada la mezcla, esta es congelada a -80°C , donde se mantiene durante 30 min en frío, siendo posteriormente centrifugada a 16000 g durante 15 min, a 4°C .
- Recogemos el sobrenadante, y resuspendemos el sedimento en una cantidad de entre 1-10 μ l de agua libre de RNasas o en una solución conteniendo 10 mM de Tris-HCl a pH 7.5.

La concentración de los mRNA y el estado de pureza se determina midiendo la densidad óptica de una alícuota a 260 nm y posteriormente realizando una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, en condiciones para RNA. Los mRNA, son guardados hasta su utilización en viales de congelación libres de RNasas, a -80°C .

Preparación de geles de agarosa para RNA: Para 100 ml.

Fundir:

Agarosa.....	2 gr.
10X MOPS.....	10 ml.
H ₂ O.....	85 ml.
Enfriar a 50 °C.	
Formaldehído.....	4.5 ml.

Preparación del 10X MOPS:

MOPS.....	200 mM.
Acetato sódico.....	50 mM.
EDTA.....	10 mM.
Ajustar el pH entre 6.5 y 7.0 con NaOH.	

Tampón de carga:

Formamida.....	72 µl.
10X MOPS.....	16 µl.
Formaldehído.....	26 µl.
H ₂ O.....	10 µl.
Glicerol.....	8 µl.
BPB.....	8 µl.
EtBr.....	10 µl.

Cada pocillo del gel es cargado con 2 µl del mRNA, mezclados con otros 10 µl del tampón de carga.

Una vez comprobada la calidad y concentración de las muestras de mRNA, estas pueden utilizarse para la construcción de la genoteca de expresión.

2.12.3 Construcción de la Genoteca de expresión de *Giardia lamblia*.

La construcción de la Genoteca de Expresión, esta basada en el Kit de Invitrogen[®] llamado SuperScript[®] Plasmid Gateway[®] Technology for cDNA Synthesis and Cloning, con adaptaciones propias de nuestro laboratorio.

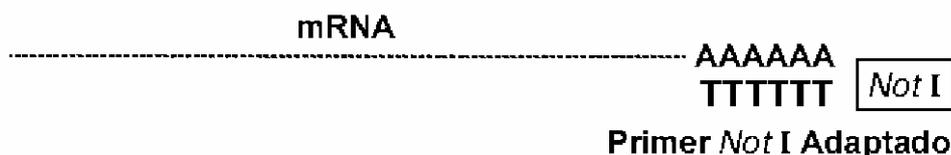
El siguiente paso para la construcción de una genoteca de expresión, una vez obtenido el mRNA, consiste en la síntesis de la primera hebra de los cDNAs.

2.12.3.1 Síntesis de la primera hebra de cDNA.

La construcción de la genoteca se inicia con 4 µg de mRNA, contenidos en un volumen total de 6 µl de agua sin RNasa, a los que se han de añadir 2 µl de Not I Primer-Adapter (0.5 µg/µl), que son fragmentos de nucleótidos especialmente diseñados, que poseen en su interior una diana específica para el enzima de restricción Not I, y en uno de sus extremos, una cola de poly-T, que hará de unión con la cola poly-A de los mRNA. Estos fragmentos, permitirán que los cDNA formados puedan unirse posteriormente, por uno de sus extremos, con los vectores de clonación (Price y col., 1992). La mezcla se calienta a 70°C, durante 10 min, y transcurrido este tiempo, se enfría rápidamente en hielo.

En la siguiente figura se muestra el esquema de cómo quedaría la unión del mRNA al cebador poly-T unido a la diana de la Not I. (Fig.10).

FIGURA 10:



Tras una breve centrifugación para recoger toda la solución en el fondo del tubo, se le añaden las siguientes soluciones hasta un volumen final de 16µl:

Tampón 5x de la 1º cadena (0.25M Tris-HCl pH 8.3,
0.375M KCl, 0.015M MgCl₂).....4 µl.
0.1M DTT.....2 µl.
10mM de una mezcla de dNTP (0.01M de cada uno)...1 µl.
RNasa OUT[®] Ribonuclease inhibitor (40 U/ µl).....1 µl.

Se mezcla el contenido del tubo mediante agitación suave, y se recoge la reacción mediante una centrifugación breve. El eppendorf se calienta nuevamente a 37°C durante 2 min, y se le añaden 4 µl del enzima SuperScript II RT (200 U/µl). Tras mezclar suavemente, se toman 2 µl de esta reacción, para comprobar que esta tiene lugar correctamente, incubándose en paralelo a la reacción madre, en un eppendorf conteniendo Dioxigenina-11-dUTP, a 37°C durante 1 h. Durante este tiempo, el enzima sintetizará la primera de las 2 hebras que constituirán el cDNA, conteniendo en uno de sus extremos la secuencia anteriormente descritas. La incubación se interrumpe sumergiendo la reacción en hielo.

En la figura siguiente (Fig.11), se muestra un esquema del producto de la reacción.

FIGURA 11:



2.12.3.2 Síntesis de la segunda hebra de cDNA.

Para la reacción de síntesis de la segunda hebra de los cDNA, hay que añadir en hielo los siguientes componentes, al producto de la anterior reacción, en el siguiente orden.

H ₂ O libre de RNasa.....	93 µl.
Tampón 5X de la reacción de la segunda hebra (0.1M Tris-HCl pH 6.9, 0.45M KCl, 0.023M MgCl ₂ , 0.75 mM β-NAD ⁺ , 0.05M(NH ₄) ₂ SO ₄).....	30 µl.
10mM de una mezcla de dNTP (0.01M de cada uno).....	3 µl.
<i>E. coli</i> DNA Ligasa (10 U/µl).....	1 µl.
<i>E. coli</i> DNA Polimerasa I (10 U/µl).....	4 µl.
<i>E. coli</i> RNasa H (2 U/µl).....	1 µl.
Volumen final.....	150 µl.

Tras agitar la mezcla, se toman 5 µl para realizar la comprobación de la síntesis de la segunda hebra del cDNA. Estos 5 µl se colocan en un eppendorf conteniendo Dioxigenina-11-dUTP, y al igual que el resto de la reacción madre, se incuban a 16 °C durante 2 horas.

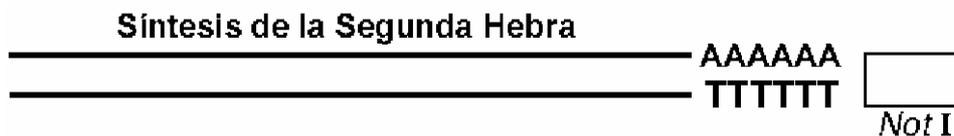
Transcurrido este tiempo, se añade a la nueva reacción madre 2 µl de DNA Polimerasa T4 (5 U/µl), y se continúa incubando a 16 °C durante 5 min. Se coloca la reacción en hielo para detener la reacción y se le añaden 10 µl de EDTA 0.5 M, terminando así la reacción de la segunda hebra de los cDNA, continuando por tanto con la purificación y aislamiento de estos cDNA.

A fin de precipitar y purificar los cDNA formados, se añade al eppendorf donde se han producido las anteriores reacciones, 150 µl de Phenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), volteando y centrifugando a temperatura ambiente durante 5 min a 14000 g para separar las distintas fases. Cuidadosamente se recogen 140 µl de la capa acuosa superior y se transfieren a un nuevo eppendorf, previamente colocado en

hielo, para que este se encuentre a 4 °C en el momento de su utilización, donde se añaden además 70 µl de NH₄OAc 7.5 M, seguido de 0.5 ml de Etanol absoluto (-20 °C). Se voltea la mezcla, e inmediatamente se centrifuga a temperatura ambiente, durante 20 min, a 14000 g, para que únicamente precipiten los fragmentos más grandes de los cDNA formados. El sobrenadante es recogido cuidadosamente, y el sedimento es lavado con 0.5 ml de Etanol al 70% (-20°C). El conjunto se centrifuga durante a 14000 g, durante 2 min, dejando secar el cDNA a 37°C durante tan solo 10 min.

En la figura siguiente (Fig.12), se muestra un esquema de la síntesis de la segunda hebra del cDNA.

FIGURA 12:



Análisis sobre la comprobación de la eficiencia de la reacción de síntesis de los cDNA.

La comprobación y análisis de la síntesis de las dos hebras del cDNA, se realiza en paralelo a las reacciones de síntesis de ambas hebras, comprobando la eficiencia de estas mediante su electroforesis en un gel de agarosa alcalino, cuya composición se describe más adelante (Maggiolini y col., 1999).

- Previo a la síntesis de los cDNA, se preparan varios eppendorf conteniendo Dioxigenina-11-dUTP, que se coloca en el fondo de estos, dejándola secar a 37 °C durante toda una noche. La cantidad de Dioxigenina-11-dUTP que ha de colocarse en cada eppendorf, será la mitad de la cantidad de dNTPs que se encuentren en el volumen que se tomará de la reacción de síntesis de cada hebra, que en nuestro caso serán de 2 µl y 5 µl respectivamente. Como se parte de una concentración stock de Dioxigenina-11-dUTP de 1 mM, en el eppendorf donde se colocarán los 2 µl tomados de la primera reacción, que contienen una concentración de dNTP de 1mM, habrá que dejar secar 1 µl del stock de Dioxigenina-11-dUTP, para que la concentración final sea de 0.5 mM. Y en el eppendorf donde se colocarán los 5 µl de la segunda reacción, que contienen una concentración de dNTP de 1mM, al igual que en la primera reacción,

habrá que dejar secar entonces 2.5 µl del stock de Dioxigenina-11-dUTP.

- Las dos alícuotas extraídas de las reacción de síntesis de ambas hebras, se adicionan a dichos eppendorf, y se incuban en paralelo a la reacción madre de la genoteca, de esta manera se une la Dioxigenina-11-dUTP al cDNA formado.
- Una vez finalizadas las dos reacciones, se toman las alícuotas resultantes, se mezclan con el tampón de carga 2X a partes iguales, y se cargan en los pocillos de un Gel de Agarosa Alcalino donde se corren por electroforesis. Este tipo de geles, causan la desnaturalización del DNA, y pueden usarse para identificar la presencia de estructuras secundarias llamadas “hairpinning”. Estas estructuras pueden ocurrir en cada una de las dos hebras, cuando estas se unen consigo mismas, formando una doble hélice anti-paralela. Los geles, pueden por tanto revelar la presencia de estas estructuras secundarias, además del rango de tamaños tanto de la primera como de la segunda hebra de los cDNA.

Para la realización de este tipo de geles se necesita:

- Agarosa

- Tampón alcalino 10X: Para 50 ml

NaOH 5 M.....	3 ml.
EDTA 5 M.....	2 ml.
H ₂ O desionizada.....	45 ml.

- Tampón de carga 2X Agarosa Alcalina:

Glicerol.....	200 µl.
H ₂ O desionizada.....	750 µl.
BPB saturado.....	46 µl.
NaOH 5 M.....	5 µl.

- Se prepara un gel de agarosa al 1% en tampón alcalino 1X, y se deja enfriar hasta que gelifique. Una vez preparado, se cargan los pocillos con la mezcla del tampón de carga junto con los cDNA, y se corre la electroforesis a 5 v/cm.
- Terminada la electroforesis, y para la realización de posteriores análisis, se transfieren los cDNA del gel a una membrana de nylon llamada Hybond-N+ de Amersham, cuya principal característica es su electropositividad. La técnica de transferencia utilizada fue la de capilaridad descrita por Southern blok (Southern 1974), y se realiza del siguiente modo: en una bandeja llena de Tampón de transferencia

formado por NaOH 5M, depositamos en medio de esta un soporte plano.

- Sobre este soporte, se colocan unas láminas de papel secante que son humedecidas con tampón de transferencia, y cuyos extremos tocan además este tampón.
- Sobre estas láminas se coloca el gel con los pocillos hacia abajo, ya que el DNA ha corrido por el fondo de los pocillos, dejando esta cara del gel en la parte de arriba.
- Sobre el gel se pone una lámina de nitrocelulosa del mismo tamaño del gel y con una de sus esquinas cortada para posteriormente orientarnos en ella.
- Encima se colocan unos cuantos trozos de papel secante del mismo tamaño que el gel, y sobre estos, se coloca una torre de servilletas secas.
- Para terminar, al final se coloca un cristal sobre la torre de servilletas, y sobre este un peso de unos 500 gr, que se equilibra continuamente para que el peso actúe de igual forma sobre toda la superficie del gel. En esta posición, se deja que actúe la capilaridad durante un día, cambiando la torre de servilletas si estas se humedecen demasiado.
- Terminada la transferencia, los cDNA son fijados a la membrana mediante radiación UV por medio de un "Crosslinker" a 120000 Julios/cm².
- Para la detección del DNA en la nitrocelulosa, se utiliza el método de Detección Colorimétrica con NBT y X-Phosfato. En la realización de este método se necesita:

- Anti-digoxigenin-AP, fragmentos Fab.
- Solución NBT.
- Solución X-Phosfato.
- Tampón 1: Ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM; pH 7.5.
- Tampón 2: 5% de leche en polvo que se disuelve en el tampón 1, y que se esteriliza en el autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 30 min.
- Tampón 3: Tris-HCl 100 mM, pH 9.5; NaCl 100 mM, MgCl₂ 50mM.
- Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM.

El proceso seguido fue:

- Se coloca la membrana sobre en una placa Petri, donde se equilibra con el tampón 1, dejándolo actuar durante 1 min, a temperatura ambiente.

- Se bloquea la membrana mediante agitación suave durante 2 horas con el tampón 2.
- Transcurrido el tiempo de bloqueo, se prepara la solución de anticuerpos, diluyendo Anti-DIG-phosfatasa alcalina 1:5000 en tampón 2, a una concentración de trabajo de 150 mU/ml, que se mezcla suavemente por inversión, incubando la membrana con esta solución durante 30 min, a temperatura ambiente.
- Tras la incubación, lavamos la membrana 2 veces seguidas, durante 15 min cada una, con suficiente cantidad de tampón 1, y la equilibramos con 20 ml de tampón 3 durante 2 min.
- Mezclamos 45 µl de la solución NBT y 35 µl de X-Phosfato en 10 ml de tampón 3, formando la solución color-sustrato, que es añadida sobre la membrana, incubándola en una placa en movimiento y en oscuridad, hasta que las señales sean visibles.
- Cuando los cDNA formados aparecen como bandas visiblemente coloreadas, se lava la membrana con 50 ml de tampón 1 durante 5 min, para detener la reacción.

Comprobado que las reacciones de síntesis de las dos hebras que conformarán los cDNA se han producido adecuadamente, y que los tamaños de estos son suficientemente grandes para la construcción de la genoteca, se puede continuar con el siguiente paso, consistente en la unión a los extremos de estos cDNA formados, de una secuencia que posee en su interior una diana para el enzima de restricción Sal I, llamada Sal I-Adapter.

2.12.3.3 Unión de la secuencia Sal I a los cDNA.

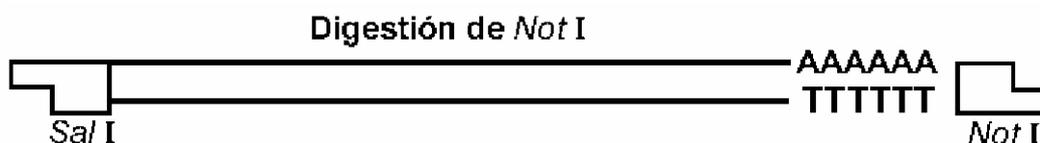
A los cDNA ya formados y aislados, que se encuentran secos, después de su aislamiento y precipitación, se les añade en frío los siguientes reactivos, en el orden mostrado.

H ₂ O libre de RNasas.....	25 µl.
Tampón 5X DNA Ligasa T4 (0.25M Tris-HCl pH 7.6, 0.05M MgCl ₂ , 0.005M ATP, 0.005M DTT, 25% (w/v) PEG 8000).....	10 µl.
Sal I-Adapter (1µg/µl).....	10 µl.
DNA Ligasa T4 (1 U/µl).....	5 µl.

Se mezcla la reacción suavemente, y se incuba a 16 °C durante un mínimo de 16 horas, o simplemente se deja actuar la reacción durante toda la noche a la temperatura del laboratorio. Durante este tiempo, los fragmentos de

Se mezcla la reacción con suaves pipeteos para resuspender el cDNA, y se incuba durante 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se vuelve a realizar una nueva extracción del cDNA obtenido, añadiendo al eppendorf de la reacción 50 µl de Phenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1). Voltar la mezcla y centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min, a 14000 g. Cuidadosamente, se recoge la fase acuosa superior, y se transfiere a un nuevo eppendorf que previamente ha sido colocado en hielo. En este nuevo eppendorf, se precipita nuevamente el cDNA con NH₄OAc 7.5 M, seguido de Etanol absoluto (-20 °C), centrifugando y enjuagando el sedimento obtenido con 0.5 ml de Etanol al 70% (-20 °C), centrifugando durante otros 2 min a 14000 g y secando cDNA a 37°C durante no más de 10 min, para evaporar el Etanol residual. Esquemáticamente, el proceso de la reacción se muestra en la figura 14.

FIGURA 14:



2.12.3.5 Purificación del cDNA mediante cromatografía.

Mediante este sistema, se separan los cDNA del tamaño apropiado, de los numerosos fragmentos de pequeño tamaño que también aparecen, para evitar en lo posible que estos no puedan ser clonados, impidiendo así la aparición de clones engañosos.

Para ello, el cDNA seco, procedente del paso anterior, se disuelve en 100 µl de Tampón TEN (10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 25 mM NaCl), previamente esterilizado, manteniéndose en hielo hasta que el sedimento se hidrate, a fin de purificarlo a través de una columna de Sephadex G25. Esta columna es previamente equilibrada con 0.8 ml de tampón TEN, repitiendo el proceso tres veces para eliminar el etanol en el que se mantiene.

Se rotulan 20 eppendorf (del 1 al 20), se colocan ordenadamente sobre una gradilla, mientras se adiciona los 100 µl del cDNA disuelto en tampón TEN en la columna, recogándose el contenido en el eppendorf marcado con el número 1. Tras la última gota obtenida, se vierten sobre la columna otros 100 µl de tampón TEN, recogándose el contenido en el eppendorf marcado como número 2. A continuación, se continúan añadiendo alícuotas de 100 µl de tampón TEN, que se van recogiendo gota a gota en los

siguientes eppendorf, hasta llegar al número 20. Medimos el volumen de cada una de las gotas obtenidas en cada eppendorf con la ayuda de una pipeta automática, y lo registramos en la columna de una tabla a la que llamaremos columna A. En la columna B, registramos el volumen acumulado de cada fracción, desde que comienza el proceso de fraccionamiento.

Nº de Eppendorf	<u>Columna A</u> Volumen de cada fracción (μ l)	<u>Columna B</u> Volumen total acumulado (μ l)
1	96	96
2	100	196
3	14.5	210.5
4	15.5	226
5	12.5	238.5
6	13.5	252
7	19	271
8	18.5	289.5
9	21.7	311.2
10	31.7	342.9
11	29.7	372.6
12	15.5	388.1
13	20.7	408.8
14	24.2	433
15	23	456
16	22.5	478.5
17	23	501.5
18	22.5	524
19	23.3	547.3
20	39.5	586.8

Para calcular las fracciones en las que se encuentran los cDNA de mayor tamaño, se siguieron las instrucciones del kit del siguiente modo: De la columna B, se identifica la fracción para la cual el volumen acumulado se acerca más a 550 μ l, pero sin excederlo, y se dibuja una línea horizontal a través de la tabla inmediatamente debajo de esta fracción identificada, puesto que las fracciones recogidas después de los 550 μ l contienen sobre todo pequeños cDNAs, que no son útiles. De igual manera, se identifica la fracción para la cual el volumen acumulado de la columna B, sobrepasa los 350 μ l, y se traza una línea horizontal inmediatamente superior, desechando las fracciones que están por encima, puesto que poseen muy poca cantidad

de cDNA. No obstante, dentro de las fracciones escogidas, no todas tienen el mismo número, ni el mismo tamaño de insertos, teniendo las primeras fracciones obtenidas un menor número de cDNA, pero de tamaños más grandes, por lo que se midió espectrofotométricamente la cantidad de cDNA contenido en cada una de las fracciones.

N° de fracción.	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Volumen de esta.	29.7	15.5	20.7	24.2	23	22.5	23	22.5	23.3
Concentración en ng/ μ l	0.15	1.25	1.04	0.98	0.85	0.90	1.01	1.10	1.03

Puesto que las primeras fracciones contienen los cDNA de mayor tamaño, se tomó la cantidad de cDNA necesaria para la construcción de la genoteca, de la primera fracción en adelante. Esta cantidad es de 10 ng, por lo que se tomaron 29.7 μ l de la primera fracción, mas 4.5 μ l de la fracción siguiente. Unimos los dos volúmenes en un solo eppendorf, y se le añade 5 μ l de tRNA de levadura (1 μ g/ μ l), 0.5 volúmenes (17.1 μ l) de NH₄OAc 7.5 M, y dos volúmenes mas de Etanol absoluto (-20 °C), para precipitar los cDNA. Volteamos la mezcla y centrifugamos a temperatura ambiente durante 20 min a 14000 g. Recogimos el sobrenadante, y lavamos el sedimento con 0.5 ml de Etanol de 70% (-20 °C). Centrifugamos durante 2 min a 14000 g, recogimos el sobrenadante, y secamos el cDNA a 37 °C durante unos 10 min. Una vez precipitado, se procedió a su unión al vector de clonación.

2.12.3.6 Ligado de los cDNA al vector de clonación.

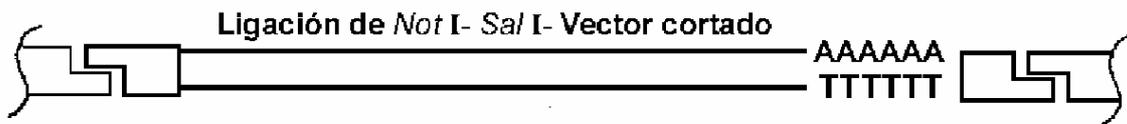
El vector de clonación es un plásmido que previamente se ha seleccionado, con la intención de que sus extremos se ligen específicamente con los extremos previamente colocados en los cDNA sintetizados. La unión específica origina que los fragmentos se unan en la dirección apropiada (5'-3'), entre el promotor *lac* y la secuencia que codifica para la β -galactosidasa, procurando de este modo que las secuencias de los cDNAs se traduzca en el sentido adecuado, obteniéndose así la expresión original de la información que codifican. En este caso, el plásmido seleccionado para cumplir esta función fue el pSPORT 1 (Wilcox y Fex 1992). Este plásmido, posee la capacidad de expresar los genes clonados y ligados, por medio de la inducción del promotor *lac*, mediante el isopropylthiol- β -galactósido (IPTG).

Para conseguir el ligado, se han de disolver 10 ng del cDNA seleccionado, en 10 µl de tampón TEN, dejando el sedimento en hielo durante 10 min, para que este se hidrate y disuelva. Una vez disuelto, a este se le añaden los siguientes componentes a temperatura ambiente:

- Tampón 5X DNA Ligasa T4 (0.25M Tris-HCl pH 7.6, 0.05M MgCl₂, 0.005M ATP, 0.005M DTT, 25% (w/v) PEG 8000).....4 µl.
- Vector de corte pSPORT 1, Not I-Sal I (50 ng/µl).....1 µl.
- H₂O libre de RNasas, suficiente para llevar el volumen hasta 19 µl.

A la mezcla anterior, se le añade 1µl de DNA Ligasa T4 (1U/µl), se agita la mezcla por pipeteo, y se incuba la reacción durante 3 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo, los cDNA se encuentran ya ligados al vector de clonación y listos para su introducción en bacterias *E.coli* electrocompetentes. En la figura siguiente se esquematiza el resultado de la reacción anterior (Fig.15).

FIGURA 15:



Transformación, mediante electroporación, de *E.coli* (ElectroMAX[®] DH10B[®]), con el producto del ligado.

La electroporación, es una técnica usada para introducir plásmidos dentro del citoplasma de las células tanto eucariotas como procariotas. Este método está basado en la aplicación a las células de un fuerte campo eléctrico, durante un breve espacio de tiempo, de alrededor de milisegundos. La inducción de este campo, origina la formación de poros en la membrana de estas células, por donde entran en su interior los plásmidos o fragmentos de DNA que se quieren introducir.

En nuestro caso, se ha utilizado para la transformación la cepa de bacterias *E.coli* denominada ElectroMAX[®] DH10B[®]. Este tipo de células especialmente preparadas para la electroporación, se las llama células electrocompetentes, y se las puede bien comprar o bien cultivar en determinadas condiciones para hacerlas electrocompetentes

A) Cultivo de bacterias electrocompetentes.

Se utilizó una cepa (ElectroMAX[®] DH10B[®]) de *E.coli* adquirida de la marca comercial Invitrogen.

- Primero, se prepara un cultivo de 10 ml de medio LB, con la cepa anteriormente mencionada de *E.coli*, que se incuba a 37°C, con fuerte agitación, durante toda una noche.
- Se toman los 10 ml de medio LB con las bacterias ya crecidas, y se vierten en 1 litro de medio LB fresco, que se continúa incubando a 37°C, con fuerte agitación.
- Cada 20 min, se toma una alícuota de este medio y se mide su densidad óptica con la ayuda de un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 600 nm. De este modo se continúa hasta que las bacterias produzcan una densidad óptica de entre 0.5 a 0.8 OD.
- Conseguida esta densidad, el medio se enfría en hielo durante 15 a 30 min. Una vez enfriado, el medio se centrifuga a 5000 rpm, a 4 °C, durante 15 min.
- El “sedimento” obtenido se resuspende en un litro de agua fría estéril, y se vuelve a centrifugar a 5000 rpm, a 4 C°, durante otros 15 min.
- El nuevo “sedimento” obtenido, se resuspende nuevamente en 500 ml de agua fría estéril, y se centrifuga nuevamente a 5000 rpm, a 4 C°, durante otros 15 min.
- El “sedimento” resultante, es ahora resuspendido en 20 ml de una mezcla fría de agua con Glicerol al 10%, y se centrifuga de igual forma que la ya mencionada anteriormente.
- Resuspendemos nuevamente el “sedimento” en 2 ml de agua fría con Glicerol al 40%, y repartimos su contenido en alícuotas de 500 µl que son introducidas en el interior de viales de congelación, donde son congeladas y almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso para la electroporación.

Previo a la electroporación, se han de preparar:

- Varios tubos de cultivo que han de ser esterilizados en el autoclave, y enfriados a temperatura ambiente, antes de su utilización.
- Esterilizar agua destilada desionizada en el autoclave.

- Preparar medio SOC estéril: Por litro.

H ₂ O desionizada.....	950 ml.
Bacto-Tryptone.....	20 gr.
Bacto-Extracto de levadura.....	5 gr.
NaCl.....	0.5 gr.

Adicionándole 10 ml de una solución de KCl 250mM (Esta solución se realiza disolviendo 1.86 gr de KCl en 100 ml de H₂O desionizada). Ajustar el pH a 7 con NaOH 5N, ajustar el volumen de la solución a 1 litro con más agua desionizada, y esterilizamos el medio en autoclave durante 20 min.

Antes de usar hay que añadirle 5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2 M. Posteriormente, hay que enfriar la mezcla por debajo de 60 °C y añadirle 20 ml de una solución de glucosa 1 M, que se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0.22 micras.

- Preparar placas de cultivo de 11cm de diámetro, conteniendo cada una de ellas unos 25 ml de medio LB o YT estéril, con agar al 1.5%, conteniendo además 100 µg/ml de ampicilina, que se han de aplicar al medio por filtración, una vez que este se ha esterilizado en el autoclave y enfriado por debajo de 60°C.

Estas placas se dejan enfriar a temperatura ambiente para que el agar solidifique, se enfríe y se evapore el exceso de agua que pueda contener. Posteriormente, se las almacena a 4 °C, en posición invertida, para que no se contaminen, por un tiempo no superior a dos semanas, impidiendo así que se degrade la ampicilina que contienen.

Medio LB: Por litro.

H ₂ O desionizada.....	950 ml.
Bacto-Tryptone.....	10 g.
Bacto-Extracto de levadura.....	5 g.
NaCl.....	10 g.

Mezclar bien, ajustando el pH a 7 con NaOH 5N, ajustando el volumen fina hasta 1 litro, y esterilizamos con el autoclave durante 20 min en un programa de líquidos.

Medio YT: Por litro.

H2O desionizada.....	950 ml.
Bacto-Tryptone.....	16 g.
Bacto-Extracto de levadura.....	10 g.
NaCl.....	5 g.

Agitamos hasta que la solución esté disuelta, ajustando el pH a 7 con NaOH 5N, enrasando hasta 1 litro con agua desionizada y esterilizamos en el autoclave durante 20 min en un programa de líquidos.

B) La electroporación.

- Se le añade al eppendorf donde se ha llevado a cabo la reacción de ligado de los plásmidos con los fragmentos de cDNA, 5 µl de tRNA de levadura, 12.5 µl de NH₄OAc 7.5M y 70 µl de Etanol absoluto (-20), para que el DNA precipite.
- Volteamos la mezcla, y centrifugamos a temperatura ambiente durante 20 min, a 14000 g.
- Descartamos el sobrenadante, lavamos el sedimento y secamos el DNA a fin de eliminar los restos de Etanol, como se ha descrito ya en repetidas ocasiones.
- Tomado el DNA precipitado, ligado ya al vector, lo disolvemos en 3 µl de agua estéril, tomando de la solución resultante 1 µl, y almacenando los restantes en el congelador de -80 °C.
- La muestra tomada, es mezclada con 20 o 25 µl de células electrocompetentes ElectroMAX[®] DH10B[®], que se encuentran congeladas a -80 °C.
- La descongelación de estas células, se realiza lentamente, introduciendo el vial en agua-hielo, consiguiendo que el índice de mortalidad de estas células se reduzca considerablemente.
- La mezcla entre los plásmidos con los cDNA ligados, y las células electrocompetentes, es realizada por pipeteo, en un eppendorf que previamente es colocado en hielo.
- Una vez homogenizada, esta es introducida en una cubeta de electroporación, previamente enfriada a 0 °C, dejando que el fluido se deslice por una de sus paredes, impidiendo así que se formen burbujas en la mezcla, que inutilizarían la electroporación.
- Se seca la cubeta muy bien por fuera, para que no queden restos de humedad que puedan producir un cortocircuito, y se procede realizar la electroporación aplicado un campo de fuerza de ~16.6 kV/cm,

durante un pulso de ~ 4 milisegundos, con una resistencia de 100 ohmios y 25 μF de intensidad de corriente eléctrica.

- Previo al choque eléctrico, se toma con una pipeta, 1 ml de medio SOC, que será adicionado a la cubeta después del proceso, a fin de que se recuperen las células lo antes posible del shock sufrido.
- Se introduce la cubeta en el electroporador, se aplica la descarga eléctrica y se le aplica en el interior el mililitro de medio SOC, pipeteando con fuerza, para que se mezcle bien con las células electrotransformadas.
- La suspensión de bacterias, es rápidamente transferida a un tubo estéril, donde se incuba durante 1 hora a 37 °C, en agitación de 90 pulsos por min (Kirill y col., 2000).
- Transcurrida una hora de incubación, se toman diversas alícuotas del medio (1, 0.1 y 0.01 μl), se llevan a 200 μl con medio LB fresco, y se siembran lo más homogéneamente posible en las placas previamente preparadas, conteniendo medio LB o YT.
- Todos los medios usados deben de contener ampicilina, al objeto de seleccionar únicamente aquellas bacterias que hayan sido electrotransformadas.
- Las placas así sembradas, son incubadas toda la noche a 37°C, mientras que las restantes células en medio SOC son almacenadas a 4 °C.
- Tras la incubación, se hace un recuento de las colonias crecidas en cada placa, y se calcula el número de colonias que podrían resultar de sembrar el mililitro de células transformadas, correspondiente al número de clones diferentes de la genoteca realizada.
- El resto del medio SOC, que contiene las bacterias electrotransformadas, del que se han tomado las alícuotas anteriormente descritas, puede ser utilizado de inmediato o puede guardarse en el congelador de -80 °C, en medio de congelación, que está constituido por medio de cultivo LB o YT, adicionado con un 40% de glicerol.

2.12.4 Comprobación de la eficiencia de transformación.

Las colonias de bacterias crecidas en el agar con ampicilina, fueron procesadas mediante la técnica denominada “minipreps”, al objeto de comprobar la existencia de insertos ligados a los plásmidos en el interior de estas bacterias.

- Para ello, se tomaron 4 muestras, de 4 colonias diferentes crecidas en las placas, y se sembraron en tubos de cultivo estériles conteniendo

1.5 ml de medio LB, junto con 100 µg/ml de ampicilina, siendo incubados durante una noche a 37 °C en agitación.

- Transcurrido el tiempo de incubación, las bacterias son centrifugadas, decantando los sobrenadantes, y aplicándoles a los sedimentos resultantes una extracción del DNA plasmídico que contienen.
- Los botones, son resuspendidos en 100 µl de una solución llamada Solución I, que se enfría previamente a 4°C. Esta solución contiene:

Glucosa.....50 mM.
Tris-HCl (pH 8).....25 mM.
EDTA (pH 8).....10 mM.

- Se voltea fuertemente para resuspender los sedimentos completamente, y se añaden 200 µl a cada tubo de la solución llamada Solución II, que está compuesta por:

NaOH..... 0.2 N.
SDS.....1%.

- Tras agitar fuertemente por inversión de los eppendorfs durante 5 veces, los dejamos en hielo y se le añade a cada uno 30 µl de cloroformo puro y 150 µl de la Solución III, a 4°C. La composición de la Solución III, es la siguiente:

Acetato potásico 5 M.....60 ml.
Ácido acético glacial.....11.5 ml.
H₂O.....28.5 ml.

- Una vez agitadas las mezclas, estas se dejan reposar en hielo de 3 a 5 min, tras lo cual se centrifugan a 12000 g, durante 5 min, a 4 °C.
- Se recogen los sobrenadantes obtenidos y se transfieren a nuevos eppendorfs, previamente colocados en hielo, en donde se precipita el DNA añadiéndoles dos volúmenes de Etanol absoluto a temperatura ambiente.
- Mezclamos bien por volteo, y dejamos reposar durante 10 min a 4 °C, para posteriormente centrifugar a 12000 g durante 5 min a 4°C.
- Los sobrenadantes obtenidos son descartados, y los sedimentos lavados con 1 ml de Etanol al 70% a 4 °C.
- Posteriormente, estos sedimentos son secados de igual forma que la ya explicada anteriormente, disolviéndose cada uno de ellos con 20 µl de H₂O desionizada estéril.

- Una vez disueltos los DNAs plasmídicos, 3 μ l de las diferentes muestras fueron mezcladas junto con 2 μ l de tampón de carga, compuesto por agua desionizada, 0.25% de azul de bromofenol, y 30% de glicerol, a fin de comprobar mediante electroforesis el estado de cada una de las extracciones.
- La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5 %, en tampón TAE (0.04 M de Tris-acetato a pH 8 y 0.001 M de EDTA), conteniendo EtBr.

En el caso en el que se detecte tras realizar la electroforesis, la presencia de RNA degradado, este ha de ser eliminado de las muestras mediante su tratamiento con RNasas.

- Para ello, se han de añadir 3 μ l de RNasa I (Invitrogen), por cada 17 μ l de DNA plasmídico, de una solución de 1 mg/ml de RNasa, a la que se le han eliminado previamente las DNasa por ebullición durante 5 a 10 min.
- Tras la eliminación de los RNA de las muestras, se ha de realizar una nueva precipitación del DNA con sales y Etanol absoluto, siguiendo los procedimientos anteriormente descritos, que eliminarán los restos del enzima utilizado.
- Una vez se encuentren los DNA plasmídicos purificados y secos, estos son disueltos en 20 μ l de H₂O destilada estéril, tomando una alícuotas de 1 μ l de cada una de las muestras, que se mezcla con 400 μ l de H₂O destilada estéril, con la que se mide la cantidad de DNA espectrofotométricamente.
- Tras medir y comprobar que las muestras poseen una gran pureza, estas se diluyen hasta conseguir que la cantidad de DNA sea del orden de 1.7 μ g/ μ l.
- Para asegurar que las muestras no contengan RNA mezclado junto con el DNA plasmídico extraído, se corre nuevamente un gel de agarosa al 1.5 % en tampón TAE, con EtBr.

Al objeto de conocer si en el interior de los plásmidos se encuentran los insertos de cDNA obtenidos en la genoteca, estudiamos el mapa de la secuencia del plásmido utilizado (pSPORT 1) y buscamos dos enzimas de restricción que cortasen a cada lado del inserto, escogiéndose la Hind III y la Eco R I (Roche). Ambas posee una secuencia diana a un lado del inserto, una temperatura óptima de actuación de 37 °C, y pueden usar el mismo tampón de acción (Tampón REACT® B. 100 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoetanol, pH 8.0). El tratamiento con las dos enzimas de restricción, se llevo acabo de la siguiente manera:

- Para cada alícuota de 2 µl de DNA plasmídico dispensada en un eppendorf, hay que poner los siguientes componentes:

DNA plasmídico.....	2 µl.
Eco R I (10 U/µl).....	2 µl.
Hind III (10 U/µl).....	2 µl.
Tampón REACT® B.....	2 µl.
H ₂ O desionizada.....	12 µl.

- La mezcla se agitó suavemente e incubó a 37 °C durante toda una noche.
- Al día siguiente, se prepara un nuevo gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE, cargando 4 pocillos, con 6 µl cada uno de cada reacción de corte del inserto, mezclados con otros 2 µl del mismo tampón de carga anteriormente utilizado, corriendo el gel a 5 v/cm, durante 20 min.

Los resultados de la electroforesis se muestra en el apartado de resultados (Páginas 113 y 114), donde se muestra como aparecen bandas de diferente Rf, indicando que el tamaño de los insertos introducidos no es igual en cada plásmido, por lo que se trata de insertos diferentes.

El siguiente paso, será por tanto encontrar el clon que porte el inserto o fragmento que codifique para la proteína que se está buscando.

2.12.5 Amplificación de la genoteca.

Una vez que nos aseguramos de que las células transformadas contienen los insertos, se procedió a la amplificación por cultivo de la genoteca. Para ello, las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo semisólido, compuesto por agar de bajo punto de fusión, al 0.27 %, para que las diferentes colonias sembradas crecieran en suspensión, evitando así la competencia entre ellas. El medio empleado fue Medio 2X LB cuya composición es la siguiente:

H ₂ O desionizada.....	950 ml.
Bacto-Tryptone.....	20 g.
Bacto-Extracto de levadura.....	10 g.
NaCl.....	10 g.

Y Medio 2X LB-Glicerol, que para 200 ml:

2X LB.....	175 ml.
Glicerol (100%).....	25 ml.

Mezclar ambos medios y esterilizar en autoclave a 120°C, y 1.5 atmósferas de presión, durante 20 min.

A 450 ml de medio 2X LB, se le añaden 1,35 gr de agarosa LM-2, de bajo punto de fusión, de la marca comercial Pronadisa, esterilizándose el conjunto en autoclave durante 30 min. Una vez esterilizado, se deja enfriar a 37 °C. Alcanzada dicha temperatura, añadimos al medio ampicilina hasta una concentración de 200 µg/ml.

- El medio semisólido, fue sembrado con aproximadamente 2×10^5 bacterias transformadas, mezclándose mediante fuerte agitación, y siendo posteriormente incubado a 37 °C, durante 40 a 45 horas sin movimiento alguno. Con este método se consigue que las colonias de bacterias no crezcan en superficie, si no que crezcan en el volumen de la agarosa, permitiendo que no exista competencia que limite su crecimiento.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se agita el contenido del bote a fin de mezclar colonias con el medio, centrifugando este a temperatura ambiente, a 10400 g, durante 20 min.
- Descartado el sobrenadante, se resuspende el sedimento en 100 ml de medio 2X LB Glicerol, que es repartido en alícuotas de 1 ml, en viales de congelación, que son congeladas y guardadas en el congelador de -80 °C, hasta que se comience el rastreo de la genoteca.

2.12.6 Inmunización de los ratones para el rastreo.

Una vez purificadas las proteínas de *Giardia lamblia*, como ya se ha descrito anteriormente, se midió su concentración mediante el método Bradfor, y se alicuotaron y liofilizaron a razón de 20 µg por alícuota, siendo congeladas a -20 °C, hasta el momento de su uso.

Antes de proceder a la inmunización, cada alícuota fue disuelta en PBS hasta alcanzar un volumen de 175 µl, y posteriormente mezclada con un volumen igual de coadyuvante completo de Freund, para la primera inmunización, realizándose las posteriores inmunizaciones con coadyuvante incompleto de Freund. Realizada la emulsión, las proteínas fueron inoculadas por inyección intraperitoneal, a razón de 10 µg de

proteína por ratón, utilizando la cepa Balb/C. La inmunización fue repetida semanalmente, durante 5 semanas, y las dosis de recuerdo se efectuaron mensualmente.

Durante el periodo que duró la inmunización, se llevo a cabo semanalmente un seguimiento de los títulos de anticuerpos generados durante el proceso.

2.12.6.1 Valoración de la inmunización. Método de ELISA.

- Para valorar los títulos durante el proceso de inmunización, se obtuvieron semanalmente, comenzando en el día 0, 10 µl de sangre periférica, de la vena de la cola, que fue absorbida sobre papel de filtro.
- Al objeto de hacer una elusión plasmática de la misma, la mancha de sangre fue recortada y sumergida en 100 µl de PBS estéril, dejándose a 4°C durante 12 horas.
- Las muestras, una vez eluidas, fueron centrifugadas a 10000 x g, durante 20 min, quedándonos con los sobrenadantes obtenidos, que fueron almacenados a -20 °C, hasta el momento de su utilización.

La técnica inmunológica usada, fue una Técnica Inmunoenzimática de ELISA.

- Para ello, placas de polietileno, de 96 pocillo de fondo plano, de la marca comercial NUNC (Nunc-Immuno® LockWell® Module Plate Polysorp), fueron sensibilizados con 100 µl de una solución que contiene el conjugado proteico, a una concentración de 2.5 µg/ml, disuelta en tampón PBS 0.125 M, a pH 8, incubándose durante 16 horas a 4 °C con agitación orbicular.
- Tras realizar la adsorción de la proteína por los pocillos de la placa, la solución antigénica fue eliminada, realizándose una serie de lavados con la solución de lavado, compuesta con PBS 0.125 M, conteniendo 0.2 % de Tween 20 (PBST).
- Tras la serie de lavados, la placa fue incubada con 250 µl por pocillo, de una solución de bloqueo compuesta por leche en polvo descremada (Molico, Nestle), diluida al 2% en PBST. Dicha solución, y al objeto de bloquear los espacios vacíos que no hubieran sido sensibilizados, se mantuvo en agitación orbicular durante 12 h a 4°C.
- Terminado el tiempo de bloqueo, se realizaron nuevos lavados con PBST para eliminar los restos de la solución de bloqueo.
- La ELISA se inició con la incubación de diferentes diluciones en PBS de los plasmas obtenidos, desde 1/100 hasta 1/6400,

añadiéndose en los pocillos sensibilizados 100 µl de estas diluciones, que se incuban durante 2 h en agitación orbicular, y a temperatura ambiente.

- Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución de los anticuerpos primarios, lavándose los pocillos repetidas veces con PBST.
- Cada uno de los pocillos fue de nuevo incubado con 100 µl de una dilución 1/1000, en PBS, del anti-suero anti-ratón unido a peroxidasa de rábano (SIGMA). La incubación se realizó en las mismas condiciones anteriormente descritas, sometiéndose los pocillos, tras la incubación con los anticuerpos secundarios, a 4 lavados en PBST.
- Posteriormente, cada pocillo se incubó con 100 µl de la solución de sustrato OPD (o-Phenilenediamine, (SIGMA)), compuesto por 10 mg de OPD, en 12.5 ml de un tampón compuesto por 0.1 M de tampón Citrato a pH 5, conteniendo en el momento de su utilización 80 µl de H₂O₂ de 110 volúmenes, por cada 100 ml de la solución anterior. La incubación se realizó a 30 °C, durante 45 min.
- Trascurrido este tiempo, la solución fue parada con 50 µl de ácido sulfúrico 0.1 N, determinándose la absorbancia en un lector de ELISA (ELISA-reader, METERTECH Σ960), a una absorbancia de 240 nm.

2.12.7 Adsorción de los sueros.

A fin de eliminar los anticuerpos anti-*Escherichia coli* existentes en los inmunosueros obtenidos, así como los existentes en el anti-suero anti-ratón (Conjugado de Fosfatasa Alcalina IgG Anti-ratón), que se iban a emplear en los inmunorrastréos de la genoteca de expresión obtenida, ambos inmunisueros fueron absorbidos sobre la cepa de bacterias *E.coli* (ElectroMAX[®] DH10B[®]).

- Para ello, un cultivo de bacterias crecidas en medio LB, durante 24 h, con fuerte agitación, a 37°C, fue centrifugado a 10000 g durante 10 min, a fin de sedimentar las bacterias.
- Tras realizar 2 lavados con PBS mediante centrifugación a 10000 g durante 10 min, las bacterias fueron fijadas en una solución de Formaldehído al 10% en agua destilada, donde se mantuvieron en suave agitación durante 24 horas.
- Una vez que las bacterias se encontraron fijadas, estas fueron centrifugadas a 10000 g durante 10 min, y lavadas al menos 4 veces con PBS, al objeto de eliminar los restos del fijador.

- Las bacterias lavadas, fueron nuevamente fijadas en 10 ml de Acetona, previamente enfriada a -20°C, durante 2 h a 4 °C, y nuevamente centrifugadas y lavadas en PBS de igual forma que la ya descrita anteriormente.
- El sedimento obtenido del último lavado, fue dividido en dos, siendo estos colocados en tubos de vidrio, a fin de poder absorber el suero, y el inmunosuero anti-ratón. Ambos sueros, fueron absorbidos a las diluciones de 1/10 y 1/5000 respectivamente, en TBST a pH 7.3, poniéndose en contacto dichos sueros con las bacterias con las que se incubaron, a 4°C, durante 12 h, con suave agitación.

Tampón TBST:

Tris-HCl pH 8.0.....	10 mM.
NaCl.....	150 mM.
Tween-20.....	0.05 %.

- Transcurrido este tiempo, los sueros fueron clarificados por centrifugación, y guardados a 4 °C, conteniendo un 0.02 % de ProClin[®] 150 (Invitrogen).
- A fin de eliminar de las paredes bacterianas los anticuerpos unidos a ellas, y a fin de permitir posteriores absorciones, estas bacterias fueron tratadas con una solución formada por 0.1M de Glicina-HCl a pH 4.5, durante tres veces, junto con posteriores centrifugaciones a 10000 g durante 10 min.
- Tras la última centrifugación, las bacterias fueron lavadas nuevamente con PBS, y los inmunisueros fueron sometidos a un nuevo proceso de absorción.
- Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó de igual modo que el ya descrito anteriormente, guardando ambas diluciones a -20 °C hasta el momento de su utilización.
- Los sedimentos de bacterias obtenidos, son nuevamente lavados otras 3 veces con la dilución de Glicina-HCl 0.1M a pH 4.5, y almacenados a -20°C hasta un nuevo uso.

2.12.8 Activación de las membranas.

El inmunorastreo de la genoteca de expresión, se realizó sobre membranas de Nitrocelulosa, (Hybond[®]-S Extra de Amersham Biosciences), sobre las que se llevaron a cabo todas las reacciones necesarias para la identificación de los clones positivos.

Previo a su utilización, las membranas han de ser pretratadas a fin de que se carguen positivamente de manera homogénea, para que se le unan las bacterias.

- Las membranas son recortadas con un tamaño igual al tamaño interior de las placas en donde se realiza la siembra de las bacterias de la genoteca, y esterilizadas en autoclave a 121°C, durante 20 min, y 1.2 atmósferas de presión, en el interior de un sobre de papel de filtro.
- Transcurrido este tiempo, se dejan secar a 37 °C, activándose posteriormente mediante su inmersión durante 30 s en metanol absoluto, y posteriormente durante 10 min en un tampón formado por Tris-HCl 25 mM; Glicina 129 mM; Metanol al 20 %, que previamente es esterilizado mediante filtración por un filtro de 0.22 µ de tamaño de poro.
- Posteriormente, se almacena esta solución a 4°C, y se secan las membranas en una estufa a 37°C, en el interior del sobre de papel de filtro, para que continúen estériles.

2.12.9 Rastreo de la genoteca.

- Para comenzar el rastreo, preparamos una serie de placas de cultivo conteniendo cada una 25 ml de medio LB estéril, con 1.5 % de agar, y 100 µg/ml de ampicilina.
- Posteriormente, se enfrían y se dejan secar las placas a temperatura ambiente, durante 30 min, tomando 4 de ellas en las que se extiende por su superficie 4 µl de una solución de IPTG (Isopropylthiol-β-galactósido) a una concentración de 0.2 µg/µl, previamente preparada y esterilizada también por filtración en un filtro de 0.22µ.
- Se dejan secar nuevamente, y se guardan a 4°C, por un periodo de tiempo no superior a 2 semanas.
- Tomamos el equivalente de 1, 0.1 y 0.01 µl, de las células transformadas y amplificadas, que constituyen la genoteca de expresión, y que se encuentran congeladas a -80 °C, y las mezclamos con 200 µl de medio LB o YT respectivamente.

- Sembramos las 3 diluciones, en 3 placas de cultivo sin IPTG, y las incubamos una noche, a 37°C. Tras este periodo, contamos el número de colonias crecidas por placa, determinando así que concentración de células hay por μl , y que cantidad es la adecuada para la realización del rastreo.
- Conocida la cantidad de bacterias adecuada para el rastreo, tomamos 4 alícuotas con esta cantidad, y las diluimos con 200 μl de medio LB, extendiendo cada dilución sobre una de las 4 placas de cultivo conteniendo IPTG, previamente preparadas. El IPTG expresará la proteína recombinante por represión de la proteína bloqueadora, que impide la síntesis de una parte de la β -galactosidasa, por lo que tras la represión, la RNA Polimerasa se une al promotor y empieza a formar el mRNA de la secuencia de nucleótidos del inserto introducido, y de los genes estructurales del fragmento de la β -galactosidasa.
- Las placas son incubadas a 37°C, durante 17-18 h, para que el tamaño de las colonias oscile entre 0.5 y 1 mm de diámetro.
- Tras este tiempo, se enfrían a 4 °C durante media hora, para que se levanten las colonias y se enfríe el agar, evitándose así, que se pegue a la nitrocelulosa de las membranas de rastreo.
- Una vez activadas las membranas, estas son colocadas sobre las placas, evitando que queden burbujas entre el agar y el filtro. Con una aguja esterilizada, pinchamos en tres puntos asimétricos, marcando la posición de la membrana en el momento de la unión, orientándonos en esta con respecto a los resultados que aparezcan.
- Minutos después, se retiran las membranas de las placas, quedando las colonias pegadas a estas, por lo que incubamos nuevamente las placas durante 2 h mas, a 37 °C, para regenerar las colonias arrancadas, almacenándolas posteriormente a 4 °C, hasta la obtención de los resultados del rastreo.
- Las membranas, son colocadas con las colonias dirigidas hacia arriba sobre un grupo de papeles de filtro humedecidos con agua, en el interior de una cámara húmeda, en la que vamos a inducir durante 15 min el tratamiento lítico de las bacterias unidas a los filtros, mediante su exposición a vapores de cloroformo.
- Terminada la lisis, las membranas son depositadas sobre 4 nuevas placas Petri, en cuyo interior hay colocado un trozo de papel Whatman 3mm, empapados en solución desnaturizante (Tris-HCl (pH 7.9) 0.02 M; Urea 6 M; NaCl 0.5 M), durante 15 min, y a temperatura ambiente. Esta solución, es la encargada de desnaturizar las proteínas que hay en contacto con la nitrocelulosa, fijándolas a esta.

- Transcurridos los 15 min, preparamos el tampón de bloqueo compuesto por gelatina porcina al 1% en tampón TBST, en la que se sumergen las membranas, durante 2 h a 37 °C, en una suave agitación.

Solución de lavado (Tampón TBST):

Tris-HCl pH 8.....	10 mM.
NaCl	150 mM.
Tween-20	0.05 %.
Azida Sódica	0.02 %.

- Incubadas las membranas en la solución de bloqueo, estas fueron lavadas, durante 15 min, en tampón TBST conteniendo 0.02% de Azida Sódica.
- Las membranas así preparadas, fueron incubadas con los sueros, a la dilución 1/25 en tampón TBST, durante 2 h a 37°C, en agitación orbicular.
- Trascurrido el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces en tampón TBST, e incubadas nuevamente durante 2 horas, a 37°C, con el inmunosuero anti-ratón Conjugado de Fosfatasa Alcalina diluido 1/5000 en TBST.
- Finalizada la nueva incubación, lavamos nuevamente las membranas con tapón TBST, y eliminamos el exceso de líquido que portan, siendo posteriormente incubadas a 37°C, en agitación, con la solución de revelado, que está compuesta por tampón fosfato alcalino, al que se le añaden 4 µl/ml de NBT y 4 µl/ml de sustrato revelador de color BCIP (Ambos de Sigma).
- La reacción se interrumpe por la inmersión de las membranas en agua, dejándolas secar a temperatura ambiente.
- Con la ayuda de los pinchazos realizados anteriormente, los resultados fueron extrapolados a las placas de cultivo, aislando las colonias que mostraron positividad.
- Tras seleccionar las colonias positivas, estas fueron aisladas con la ayuda de unas puntas estériles, siendo crecidas en medio LB conteniendo 100 µgr/ml de ampicilina, en agitación durante 12 horas.
- Obtenida la máxima densidad de crecimiento, las bacterias fueron centrifugadas a 10000 g durante 10 min a 4°C, resuspendiendo el sedimento obtenido en 1 ml de medio de congelación constituido por medio LB conteniendo Glicerol al 12.5 %. Dicho sedimento fue

introducido en viales de congelación, manteniéndolos congelados a -80°C para posteriores análisis de cada uno de los clones positivos.

2.12.10 Secuenciación de los clones positivos.

- Una vez aislados y congelados los clones positivos, estos fueron descongelados lentamente a 0°C , tomando una pequeña alícuota de cada uno ellos, que se cultiva a 37°C durante toda una noche con fuerte agitación, en un tubo de cultivo estéril, conteniendo 1.5 ml de medio LB junto con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina.
- Trascorrido este tiempo, el contenido de los tubos fue centrifugado, descartándose el sobrenadante, y realizándose una extracción del DNA plasmídico a los sedimentos obtenidos, de igual forma que la ya descrita anteriormente, salvo que junto a la solución I, se añadió 1 mg/ml de RNasa I.
- Tras obtener el DNA plasmídico, este fue disuelto en 50 μl de H_2O destilada estéril, medimos la cantidad de DNA por muestra y ajustando la concentración final hasta 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ con agua.

Al objeto de realizar la secuenciación de los insertos ligados a los plásmidos, fue necesario realizar una reacción de PCR de secuenciación, donde se originan múltiples copias de cada una de las dos hebras del DNA. Las diferentes copias originadas por esta PCR, serán después procesadas en los capilares del secuenciador.

De cada uno de estos insertos, se realizan dos reacciones de PCR diferentes. En una se utiliza el cebador estandarizado llamado SP6, mientras que en la otra se utiliza el cebador denominado T7. Ambos cebadores tienen una secuencia diana integrada en el plásmido pSPORT 1, denominada promotor, colocada cada una, a un lado del lugar donde se insertan los cDNAs sintetizados en la genoteca, así podrán solaparse los resultados de ambas hebras y asegurarse que son complementarias al 100%. De no ser así, se deben de secuenciar de nuevo para conocer cuales son los resultados mas probables en cada una de las posiciones de los nucleótidos del inserto.

En esta reacción de PCR, junto con los DNAs plasmídicos y los cebadores anteriormente mencionados, se utiliza un kit de secuenciación de Applied Biosystems llamado Cycle Sequencing Kit ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 compuesto por un Tampón de secuenciación 5X, y un Mix de secuenciación que contiene la polimerasa, las sales recomendadas para el buen ambiente iónico que favorezca el funcionamiento de la PCR, y los ddNTPs fluorescentes.

Tras tener todos los componentes de la PCR preparados, estos han de ser mezclados en la siguiente proporción y en el orden mostrado, por reacción:

Mezcla de secuenciación.....	2 µl.
Tampón de secuenciación 5X.....	2 µl.
DNA plasmídico (400 ng).....	2 µl.
Cebador (1µM).....	3.2 µl.
H ₂ O desionizada.....	10.8 µl.

Obteniéndose un volumen final de 20 µl por reacción.

Cada una de estas reacciones, son posteriormente colocadas en el interior del termociclador, que es programado del siguiente modo:

PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO
Pre calentamiento	96 °C	3 Min.
25 Ciclos	96 °C	10 S.
	50 °C	5 S.
	60 °C	4 Min.
Almacenamiento	4 °C	∞

- Una vez que termina la reacción de la PCR, se pasa a continuación a precipitar las secuencias de DNA formadas en esta reacción, mediante la adición a cada uno de los eppendorf, de 62.5 µl de Etanol al 95%, 3.0 µl de AcNa (Acetato sódico) 3M (pH 4.6), y 14.5 µl de H₂O.
- Incubamos la mezcla durante 15 min y centrifugamos a 14000 rpm durante 20min.
- Los DNA precipitados son lavados, añadiéndoles 250 µl de Etanol al 70%, siendo centrifugados durante 10 min a 14000 rpm.
- Los sedimentos obtenidos son secados a 37 °C, durante no más de 10 min para que se evapore el etanol que aún quede, pero sin permitir que se sequen demasiado, añadiéndoles posteriormente a cada uno 20 µl de formamida especial para la secuenciación.
- Tras agitar fuertemente, recogemos los contenidos mediante una breve centrifugación, y los guardamos a 4 °C en oscuridad, hasta su posterior inclusión en los capilares del secuenciador.
- Una vez conocidas cuales son las secuencias de cada uno de los fragmentos amplificados por PCR, estas son comparadas con la secuencia del plásmido original, orientándose aun lado o a otro en función del cebador utilizado en cada reacción, consiguiendo así

delimitar las secuencias de cada una de las hebras que componen los insertos aislados.

Conocidas las secuencias de nucleótidos que portaban los insertos de los clones seleccionados, sobre estas fueron aplicadas una serie de herramientas informáticas para conocer la función de los péptidos que codificaban. De esta forma, lo primero que se aplicó fue un BLAST a las secuencias obtenidas para conocer que homologías presentaban con las proteínas conocidas de las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ. Posteriormente utilizamos el programa Transeq del paquete EMBOSS para conocer las posibles proteínas que se pudieran transcribir de las secuencias de nucleótidos obtenidas, según las seis posibles pautas de lectura en las que estas se pudiesen leer.

Posteriormente seleccionamos las pautas de lectura más probable de cada una de las secuencias, en función de la posición de los codones de terminación en cada una de ellas, y de las homologías que presentaban con proteínas conocidas de las bases de datos mediante la realización de BLAST de la secuencia de aminoácidos de cada una de las pautas de lectura.

A continuación, para la predicción de intrones se utilizó el programa netgene2 disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>. Este programa consiste en una red neuronal que realiza predicciones de lugares de corte de intrones en genes de humanos, de *Caenorhabditis elegans* y de *Arabidopsis thaliana*. La comparación de estos lugares, junto con el potencial codificante de diferentes regiones, permite obtener datos que nos pueden ayudar a la identificación de intrones (Hebsgaard y col., 1996; Brunak y col., 1991).

De todos los insertos seleccionados, solo el que presentó un número de nucleótidos aceptable, junto con una elevada homología con secuencias existentes de *Giardia*, se seleccionó para los posteriores experimentos inmunológicos.

2.12.11 Pruebas inmunológicas.

2.12.11.1 Purificación de las proteínas totales de las bacterias con el inserto seleccionado.

Conocida la secuencia del inserto seleccionado, el siguiente paso consistió en comprobar si los sueros de los ratones inmunizados con las FABP de *Giardia*, y las salivas de pacientes enfermos con una giardiosis activa, eran capaces de detectar la proteína que codificaba este inserto seleccionado.

- Tras cultivar una alícuota de bacterias del clon seleccionado en 500 ml de medio LB, adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y 100 µl de IPTG (0.2 µgr/µl), las bacterias crecidas fueron lavadas y concentradas por centrifugación a 12000 g durante 10 min, a 4°C, a fin de eliminar los restos de medio cultivo.
- El sedimento fue resuspendido en 6 ml de tampón de lisis compuesto por:

Tris-HCl pH 8.....	50 mM.
Sacarosa.....	25 %.
EDTA.....	1 mM.
Inhibidores de Proteasas.....	100 mM.
Lisozima.....	60 mg/ml.

Los Inhibidores de Proteasas (Complete Mini, Boehringer Mannheim GMBH), son los mismos que los utilizados para la purificación de las FABP de *Giardia*.

- El tampón, se deja actuar durante 40 min a 20 °C en agitación, para que la lisozima actúe sobre las paredes bacterianas.
- Sonicamos durante 1 min a 0°C, repitiendo la sonicación durante 10 ciclos.
- Tras la sonicación, añadimos 1 volumen por cada 100 de MgCl₂ 2M, 1 volumen por cada 100 de MnCl₂ 1M, y 130 µl de DNasa I a una concentración de 1mgr/ml. Al objeto de fluidificar el extracto, la mezcla fue agitada activamente, incubándose a 37 °C durante 15 min.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se añade:

PBS 10X.....	3.4 ml.
Tritón X-100.....	20 %.
Tween 20.....	20 %.
DTT 1M.....	340 µl.

- Se mezcla y se incuba durante 1 hora a 37°C, centrifugando posteriormente a 18000 g, a 4 °C durante 20 min.
- Descartamos el sedimento con los restos bacterianos no solubilizados, sometiendo el sobrenadante a una posterior cromatografía por columna de Bio-Beads® SM-2 (BIO-RAD), de igual modo que como ya se explicó en su momento, a fin de eliminar el detergente usado, y una posterior cromatografía a través de una columna de Lipidex-1000, a fin de eliminar los ácidos grasos libres o ligados que pudiera contener la muestra.
- Posteriormente, se realizó una cromatografía por Sepharosa Epoxy 4B (Pharmacia Biotech), ligada a un ácido graso, que en nuestro caso fue Ácido Butírico, por la que pasamos solamente una pequeña alícuota de la muestra, por si la proteína sintetizada por el inserto es ligeramente diferente a la original.
- Una vez finalizadas las cromatografías, las diferentes muestras obtenidas, fueron dializadas en membranas de diálisis de 3500 Da. de tamaño de poro, previamente activadas.
- Tras la dialización de las muestras, se observó como en el interior de las membranas de diálisis, parte del contenido había precipitado, por lo que las muestras, se centrifugaron a 4500 g, a 4 °C, durante 20 min, colocando por separado cada una de las fracciones obtenidas (sobrenadantes y precipitados), que se congelan a -20 °C para su posterior liofilización.
- Cuando las muestras estuvieron liofilizadas, se procedió a la desnaturalización de las proteínas existentes en ellas mediante la utilización del tampón de la muestra, realizándose posteriormente una electroforesis de cada una de estas muestras, en SDS-PAGE, en geles de Poliacrilamida al 12,5% (Phast Gel Homogeneous 12,5) y al 20% (Phast Gel Homogeneous 20), tiñendo los geles obtenidos con Nitrato de Plata.

Algunas de las electroforesis, fueron utilizadas para llevar a cabo inmunoblot de acuerdo con la metodología descrita anteriormente (Towbin y col. en 1979; Timmons y Dunbar, 1990), utilizando los sueros de los ratones, previamente inmunizados con las FABP de *Giardia*, así como las salivas de personas enfermas con una giardiosis activa.

- Para ello, una vez realizadas las electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond™-C Extra de Amersham Biosciences.
- Tras teñir con Rojo Ponceau para visualizar las bandas transferidas, las membranas fueron bloqueadas con tampón de bloqueo.

- Bloqueadas las membranas, estas fueron lavadas tres veces seguidas, durante 10 min cada una, con tampón de lavado, e incubadas con una dilución de salivas 1/100, durante 2 horas a 37°C, mientras que otras membranas fueron incubadas con los sueros de los ratones previamente inmunizados, también a la dilución 1/100. Ambas soluciones, habían sido previamente adsorbidas con bacterias *E. coli* sin transformar.
- Tras la incubación, lavamos las membranas de igual modo que el mencionado anteriormente.
- Realizado el último lavado, las membranas tratadas con los sueros de los ratones fueron incubadas con anti-IgG anti-ratón marcado con Peroxidasa, a la dilución 1/800 en PBS, mientras que en los casos en que se emplearon salivas, las membranas se incubaron con anti-Factor Secretor IgA anti-humano marcado con Peroxidasa, diluido igualmente a una concentración de 1/800 en PBS, previamente adsorbidos sobre bacterias *E. coli* sin transformar. En ambos casos, las incubaciones se realizaron durante 2 h a 20 °C.
- Lavamos posteriormente las membranas de igual modo que el ya mencionado anteriormente, y las incubamos a 37 °C, en un tampón conteniendo el sustrato de peroxidasa, compuesto por:

Tris-HCl pH 7.4.....0.1 M.
 3-3 Diaminobencidina Tetrahidroclorhídrico.....0.05 %.
 H₂O₂ (10 volúmenes).....0.05 %.

- La reacción fue parada con agua destilada, conteniendo 40 µl de ácido sulfúrico 0.1N, lavándose y secándose posteriormente, al objeto de estudiar las bandas reconocidas.

3 RESULTADOS.

3.1 Resultados del rendimiento en la purificación de las proteínas FABP.

En la tabla 3.1, se muestran los rendimientos obtenidos en cada uno de los pasos de los que consta el proceso de purificación de las proteínas FABP de *Giardia*.

TABLA: 3.1.

Pasos de la purificación.	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>†	<u>G</u>
Paso: Lisado y homogenizado de los trofozoítos.	8.5	2.45	20.825	20.825	100	0.1042	100
Paso: Sobrenadante Post centrifugación.	8.0	2.18	17.44	18.530	83.74	0.1095	96
Paso: Eluido Post cromatografía Bio-Bead.	7.5	0.87	6.525	7.395	31.33	0.093	84.7
Paso: Eluido Post cromatografía Lipidex.	7.0	0.71	4.97	6.035	23.86	0.091	83.1
Paso: Eluido Post cromatografía de Afinidad.	6.5	0.065	0.4225	0.5525	2.03	0.0582	53.13

A: Volumen total en cada paso, medido en ml.

B: Concentración de proteína en cada paso, medido en mg/ml.

C: Cantidad de proteína total, calculada en el volumen medido por paso, en mg.

D: Cantidad de proteína total, calculada del volumen inicial de 8.5 ml, medido en mg.

E: Concentración de proteína (%).

F: Rendimiento RDp (%): † Valores relativos de fluorescencia obtenidos por medio de la fórmula, $Dp = \frac{Fm - Ff}{Fp} \times Ft$, donde RDp = Valores relativos de DAUDA unido a la proteína FABP. Fm = Fluorescencia obtenida por DAUDA (1 mM), emitiendo a 500 nm y excitando a 330 nm, en presencia de 400 mg de proteína FABP. Fp = Fluorescencia obtenida por DAUDA (1 mM), emitiendo a 500 nm y excitando a 330 nm en presencia de 4 mg de proteína procedente de los diferentes pasos de la purificación. Ff = Fluorescencia obtenida por DAUDA (1 mM), emitiendo a 500 nm y excitando a 330 nm, en ausencia de proteína.

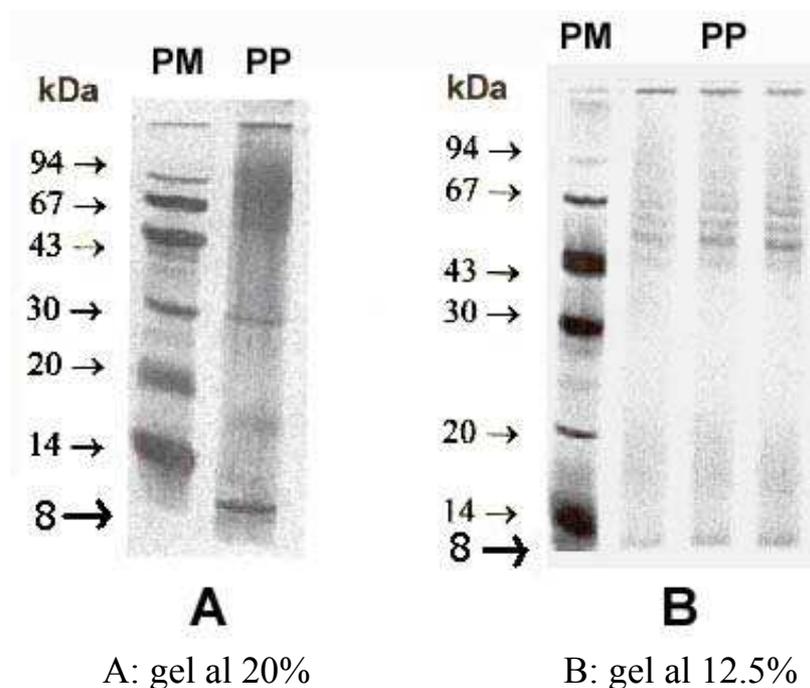
G: Rendimiento del proceso en cada tramo (%).

3.2 Análisis de las electroforesis de las FABP.

En la figura 16, se muestran los resultados de las electroforesis SDS-PAGE, realizadas tanto a las proteínas marcadoras (PM), como a las muestras de proteínas purificadas (PP) mediante cromatografía de afinidad, en condiciones no reductoras. Se pueden observar hasta 13 bandas en la fracción purificada, que quizás correspondan con agregaciones de la proteína purificada, como posteriormente se discute.

En la figura 16.A, se muestran las bandas obtenidas de las proteínas purificadas, separadas en un gel de Poliacrilamida al 20 %. En la figura 16.B, se observa el proteinograma correspondiente a un gel de Poliacrilamida al 12.5 %.

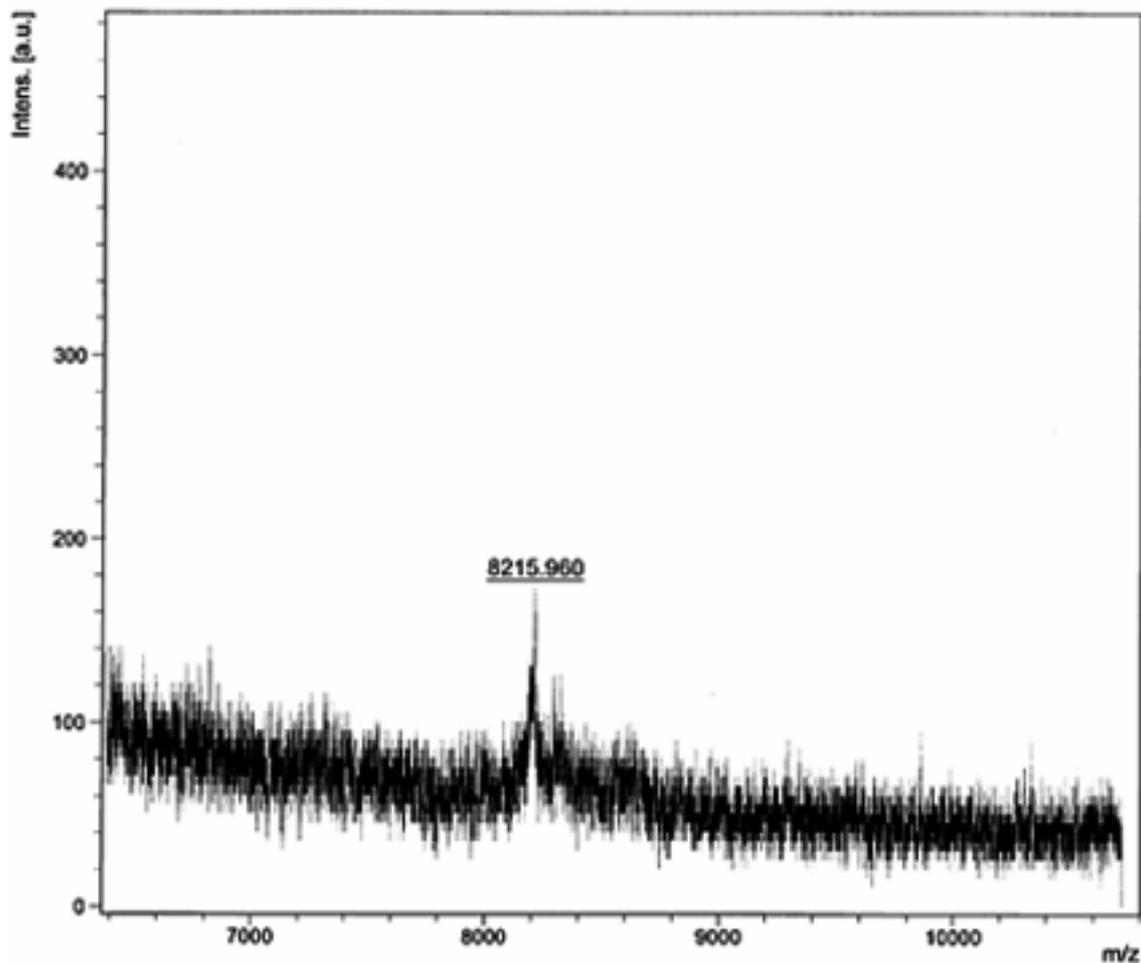
FIGURA: 16.



3.3 Resultados de la prueba del Maldi-tof.

La figura 17, muestra el espectrograma de la proteína purificada por cromatografía de afinidad, al ser estudiada por espectrometría de Maldi-tof. Se observa como solamente aparece un pico de proteínas, con un peso molecular de 8.215 Da., peso molecular muy similar al que aparece reflejado en las electroforesis realizadas en SDS PAGE, que se muestran en las imágenes previas.

FIGURA: 17.



3.4 Composición en aminoácidos de las FABP.

La figura 18, muestra la tabla de aminoácidos resultante del análisis porcentual de la banda correspondiente a 8 kDa. En ella se puede apreciar como hay aminoácidos que se encuentran en una alta concentración, como son la Glutamina o la Glicina, y otros aminoácidos que se encuentran en una muy baja concentración como son la Lisina, la Fenilalanina, la Treonina, o la Metionina.

FIGURA: 18.

Date: 12/06/2002								Hydrolyse	vapeurs HCL+TFA	45 mins/150°
Dilución:	2	W.Saple µg								
Amino-acid		Sample	N° moles	Residues (0/00)	Residues (%)	Residues (/Lys)	Residues (/Arg)	Quantity/50ul (n° grammes)	Total quantity (µgrammes)	% sample hydrolysed
Hyp			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
Asp			0.10	102.04	10.20			11.51	0.02	
Thr			0.03	30.61	3.06			3.04	0.01	
Ser			0.09	91.84	9.18			7.84	0.02	
Sar			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
Glu			0.14	142.86	14.29			18.07	0.04	
Pro			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
Gly			0.17	173.47	17.35			9.70	0.02	
Ala			0.04	40.82	4.08			2.84	0.01	
Cysteine			ND	ND	ND			ND	ND	
Val			0.11	112.24	11.22			10.91	0.02	
Met			0.04	40.82	4.08			5.25	0.01	
Lle			0.07	71.43	7.14			7.92	0.02	
Leu			0.10	102.04	10.20			11.32	0.02	
Tyr			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
Phe			0.03	30.61	3.06			4.42	0.01	
His			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
H. Lys			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
Lys			0.06	61.22	6.12			7.69	0.02	
Trp			ND	ND	ND			ND	ND	
Arg			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
Bala			ND	ND	ND			ND	ND	
Des + Isd			0.00	0.00	0.00			0.00	0.00	
			0.98	1000	100			100.51	0.20	

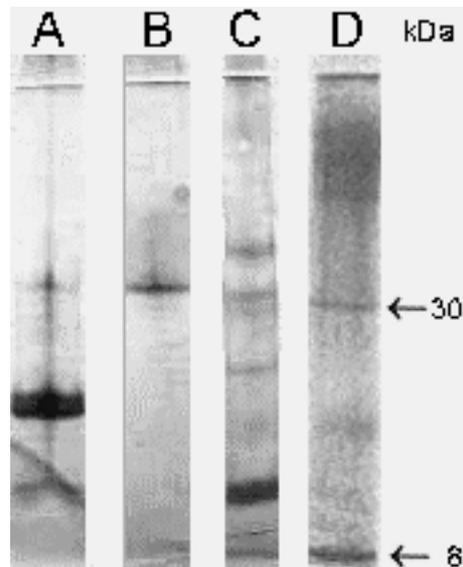
La cantidad total de AA en la muestra hidrolizada es de: 0.20 µg

3.5 Análisis de las agrupaciones de fragmentos de las proteínas.

La figura 19, muestra el resultado de la electroforesis SDS-PAGE, al 12,5%, en condiciones no reductoras, de las proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad, tras realizar una microdigestión con papaína o con tripsina inmovilizada, dos enzimas que cortan por los aminoácidos Phenilalanina y Lisina respectivamente.

El resultado del tratamiento con estos dos enzimas puede verse en las figuras mostradas a continuación, en donde se observa que los fragmentos resultantes del tratamiento muestran un mayor peso molecular del esperado, incluso mayor que el de la propia proteína de la muestra original.

FIGURA: 19.

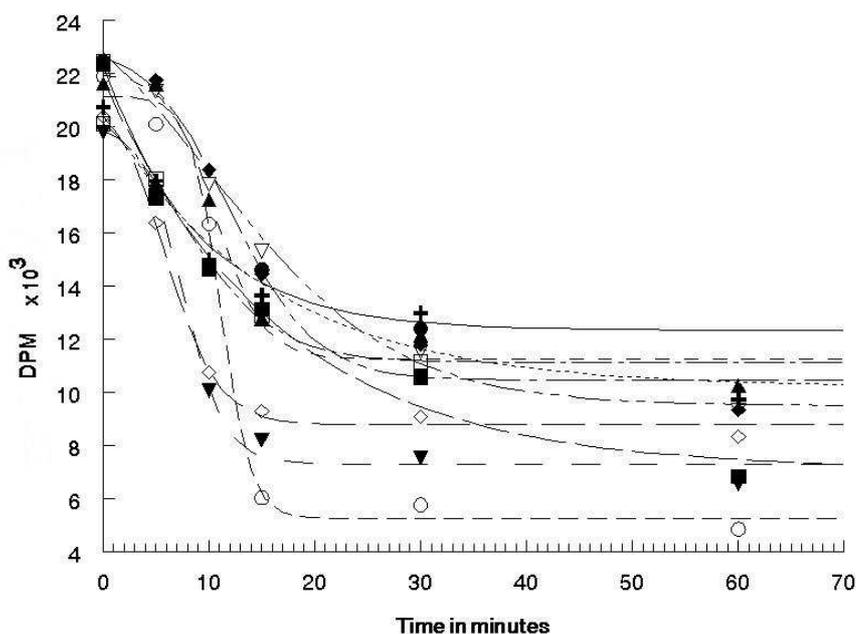


A: Electroforesis del resultado del tratamiento de las FABP con Papaína. **B:** Electroforesis del resultado del tratamiento de las FABP con Tripsina. **C:** Proteínas marcadoras. **D** Electroforesis de las proteínas FABP sin tratar.

3.6 Análisis del desplazamiento con ácido oleico radiactivo.

El estudio del desplazamiento en función del tiempo, del ácido oleico radiactivo ligado a las proteínas FABP, por parte del Taurocolato, Glycocolato, Deoxycolato, Ácido Palmítico y Ácido Araquidónico, se muestra en la grafica 3.6.

GRAFICA: 3.6.



Desplazamiento del ácido oleico marcado en función del tiempo por los siguientes productos: (∇) Ácido Araquidónico, (♦) Ácido Palmítico, (▼) Taurocolato, (◇) Glicocolato, (■) Desoxicolato, (●) α-Tocofenol, (▲) Ácido Butírico, (○) Metronidazol, (+) Ácido Retinoico, (□) Testosterona.

Analizados los resultados obtenidos procedentes del centelleo líquido, mediante el programa informático LIGAND-PC (Biosorf, Cambridge, U.K.), se obtuvo una constante de desplazamiento para el ácido oleico K_d de 3.12×10^{-8} M. Pudiéndose observar como el desplazamiento del ácido oleico radiactivo se produce en los primeros 15 minutos de la incubación. Cuando mediante centelleo líquido se estudio la unión del oleico radiactivo a las bandas de proteínas correspondientes a la fracción purificada de las FABP, se observó que únicamente la fracción de peso molecular correspondiente a 8 kDa era capaz de captar al ácido oleico marcado, aun cuando tras la electroelución de estas bandas, se originaran bandas de mayor peso molecular.

A pesar de que las FABP representan un objeto de estudio que promete resultados interesantes en la lucha contra este parásito, nuestra intención no se limita al estudio de ésta proteína, sino que pretendemos intentar el aislamiento de su gen a pesar del total desconocimiento que se tiene en la actualidad acerca de su secuencia y de no disponer de herramientas apropiadas para ello. Asimismo no descartamos la posibilidad de encontrar algún otro gen que codificase otro tipo de proteínas que pudiesen tener suficiente poder antigénico para los objetivos que persigue este tipo de trabajo. Para ello utilizamos varios tipos de aproximaciones cuyos resultados relatamos a continuación.

3.7 Valoración de la amplificación del cDNA de las FABP de *Giardia*, mediante PCR.

Con el objeto de diseñar unos oligonucleótidos adecuados para la amplificación de algún fragmento de este gen, se eligieron las regiones más conservadas, deducidas de la comparación entre las secuencias tanto a nivel de proteínas como de DNA, obtenidas de las bases de datos Swiss-Prot y EMBL. Se compararon entre sí las secuencias de *Schistosoma mansoni* (P29498), *Schistosoma japonicum* (O45035), *Fasciola gigantica* (Q94567), *Fasciola hepatica* (Q9U1G6), *Echinococcus granulosus* (Q02970), *Mus musculus* (P04117), *Sus scrofa* (O97788), *Caenorhabditis elegans* (O02323), *Homo sapiens* (P15090), dándole una mayor relevancia a las comparaciones de genes procedentes de especies parásitas evolutivamente más próximas a *Giardia*, como *Schistosoma*, *Fasciola*, *Echinococcus*. Se realizaron así alineamientos múltiples con el software ClustalX, implicando a las diferentes combinaciones de especies.

A modo de ejemplo, se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos de las proteínas comparadas, seguidas del alineamiento que incluyó a la totalidad de las especies comparadas.

Secuencias de aminoácidos:

Echinococcus granulosus.

MEAF LGTWKM EKSEGF DKIM ERLGVDFVTR KMGNLVKPNL IVTDLGGGKY
 KMRSESTFKT TECSFKLGKE FKEVTPDSRE VASLITVENG VMKHEQDDKT
 KVTYIERVVE GNELKATVKV DEVV CVRTYS KVA

Schistosoma mansoni.

MSSFLGKWKL SESHNFDAVM SKLGVSWATR QIGNTVTPTV TFTMDGDKMT
 MLTESTFKNL SCTFKFGEEF DEKTS DGRNV KSVVEKNSES KLTQTQVDPK
 NTTVIVREVD GDTMKTTVTV GDVTAIRNYK RLS

Schistosoma japonicum.

MSSFLGKWKL SESHNFDAVM SKLGVSWATR QIGNTVTPTV TFTMDGDTMT
MLTESTFKNL SVTFKFGEEF DEKTS DGRSV KSVVTKDSES KITHTQKDSK
NTTVIVREIV GDTMKTTVTV DDVT AIRNYK RL

Caenorhabditis elegans.

MASMNDFIGR WKL VQ TENFD EYMKEIGVGL ITRKAAHLK PILEIRLDGE
TWNFDQFSTF KNTKLSFKLG EEFVENS PDD RTYNSLFTFE NGKLTHRQNK
IKENHKSSVL TTWLENGKLI QTYQSGDVIC RREWERE

Fasciola gigantica.

SWKYGDSENM EAYLKKLGIS SDMVDKILNA KPEFTFTLEG NQMTIKMVSS
LTKKITTFTF GEEFK EETAD GKTAMTTVTK DSESKMTQVT TGPEYTHV
REVVGDKMIA TWTVGDVKAV TTLLKA

Fasciola hepatica.

MANFVGSWKL EQSENMDAVL QKLG INVIKR KLITSSKPEI TFTLEGNKMT
MKTVSALKTT VISFTFGEEF KEETADGRTV MTTFTKSDS KISQVQKCP
NTTHVVREVT GGKMIATVTV GDVKAVNNYH KV

Mus musculus.

CDAFVGTWKL VSSENFDDYM KEVGVGFATR KVAGMAKPNM IISVNGDLVT
IRSESTFKNT EISFKLGVEF DEITADDRKV KSIITLDGGA LVQVQKWDGK
STTIKRKRDRG DKL VVECVMK GVTSTRVYER A

Sus scrofa.

CDAFVGTWKL VSSENFDDYM KEVGVGFATR KVAGMAKPNL IITVNGDMIT
IRSESTFKNT EIAFKLGQEF DEVTADDRKV KSTITLDGGA LVQVQKWDGK
TTTINRKIVD DKL VVECIMK GVTATRIYER A

Homo sapiens.

CDAFVGTWKL VSSENFDDYM KEVGVGFATR KVAGMAKPNM IISVNGDVIT
IKSESTFKNT EISFILGQEF DEVTADDRKV KSTITLDGGV LVHVQKWDGK
STTIKRKRRED DKL VVECVMK GVTSTRVYER

Secuencias de aminoácidos de las proteínas FABP de las diferentes especies utilizadas en los alineamientos.

CLUSTAL W (1.83) Alineamiento de múltiples secuencias.

```

m_musculus      ---CDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKKVAGMAKPNMIIS-VNGDLVTIRSEST 56
h_sapiens       ---CDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKKVAGMAKPNMIIS-VNGDVITIKSEST 56
s_scrofa        ---CDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKKVAGMAKPNLIIT-VNGDMITIRSEST 56
c_elegans       MASMNDFIGRWKLVQTFENFDEYMKIEIGVGLITRKAHAHLKPILEIR-LDGETWTFDQFST 59
e_granulosus   ---MEAFVLTWKMKEKSEGFDFKIMERLGVDFVTRKMGNLVKNLIVTDLGGGKYKMRSEST 57
s_mansoni      ---MSSFVLGKWKLESEHNFDAVMSKLGVSWATRQIGNTVTPVTFVT-MDGDKMTMLTEST 56
s_japonicum    ---MSSFVLGKWKLESEHNFDAVMSKLGVSWATRQIGNTVTPVTFVT-MDGDVMTMLTEST 56
f_gigantica    -----SWKYGDSENMAYLKKLGISSDMVDKILNAKPEFTFT-LEGNQMTIKMVSS 50
f_hepatica     ---MANFVGSWKLEQSENMDAVLQKLGINVIKRKLITSSKPEITFT-LEGNKMTMKTVSA 56
                ::  **  . . . . : : . . : * . . : * . . : * :

m_musculus      FKNTEISFKLGVFDEITADDRKVKSIITLDG-GALVQVQ---KWDGKSTTIKRKRGDGK 112
h_sapiens       FKNTEISFILGQEFDEVTADDRKVKSTITLDG-GVLVHVQ---KWDGKSTTIKRKREDDK 112
s_scrofa        FKNTEIAFKLQGFDEVTADDRKVKSTITLDG-GALVQVQ---KWDGKTTTINRKIVDDK 112
c_elegans       FKNLTSFKLGEFVENSFDDRTYNSLFTFEN-GKLTHRQNKIKENHKSSVLTWLENGK 118
e_granulosus   FKTTECSFKLGKFEKVEVTPDSREVASLITVEN-GVMKHEQ---DDKTQVTVYIERVVEGNE 113
s_mansoni      FKNLSCTFKFGEEFDEKTSDGRNVKSVVTKNSESKLTQTQ---VDPKNTTVIVREVDGDT 113
s_japonicum    FKNLSVTFKFGEEFDEKTSDGRSVKSVVTKDSESKITHTQ---KDSKNTTVIVREIVGDT 113
f_gigantica    LKTKITTFTFGEEFKETADGKTAMTTFVKDSESKMTQVT---TGPEYTHVREVVGDK 107
f_hepatica     LKTTVISFTFGEEFKETADGRTVMTTFVKDSDSKISQVQ---KCPENTTHVREVTGGK 113
                :* . : * : * * * : . * : : . : . : : : : : : : : :

m_musculus      LVVECVMKGVVSTRVYERA- 131
h_sapiens       LVVECVMKGVVSTRVYER-- 130
s_scrofa        LVVECVMKGVVSTRVYERA- 131
c_elegans       LIQTYQSGDVICRREWERE- 137
e_granulosus   LKATVKVDEVVVCVRYTSKVA 133
s_mansoni      MKTTVTVGDVTAIRNYKRLS 133
s_japonicum    MKTTVTVDDVTAIRNYKRL- 132
f_gigantica    MIATWTVGDVKAVTLLKA- 126
f_hepatica     MIATVTVGDVKAVNNYHKV- 132
                : * . :

```

* Coincidencia de aminoácido.

Nombres completos de las especies: m_musculus = *Mus musculus*; h_sapiens = *Homo sapiens*; s_scrofa = *Sus scrofa*; c_elegans = *Caenorhabditis elegans*; e_granulosus = *Echinococcus granulosus*; s_mansoni = *Schistosoma mansoni*; s_japonicum = *Schistosoma japonicum*; f_gigantica = *Fasciola gigantica*; f_hepatica = *Fasciola hepatica*.

Secuencias de nucleótidos:

Echinococcus granulosus.

ATGGAGGCAT TCCTTGGTAC CTGGAAGATG GAGAAAAGTG AGGGTTTCGA
 CAAGATCATG GAACGCCTTG GGGTGGATTT CGTCACTCGC AAGATGGGCA
 ATTTGGTTAA ACCCAACCTC ATAGTCACTG ATCTGGGTGG CGGCAAGTAT
 AAAATGAGAT CGGAGAGCAC GTTCAAGACC ACCGAATGCT CCTTCAAAC
 GGGTGAGAAG TTCAAGGAGG TGACTIONCGGA TTCACGCGAG GTCGCTTCAT
 TGATCACAGT GGAGAATGGG GTGATGAAGC ATGAGCAGGA TGACAAAACC
 AAGGTCACCT ACATTGAACG TGTGGTTGAA GGCAATGAGC TGAAAGCGAC
 CGTGAAGGTG GATGAAGTGG TTTGCGTGCG AACCTACTCA AAGGTGGCGT
 AAGTGAGGTT CTCGTTCCCA AGTTGTTTCC CTCCTCTCCA TACCACTCCC
 ACATCTTTCT CCTCCTTTCC AGCTATACTC CTACCTTGAT GTGAAGTATA
 AAGCGCCTTT TTTCTTGTCT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 AAAAAA

Schistosoma mansoni.

GTATCAGCTT TGGCGTTTAA TCAATCGCGA ATCCTACACC AGAAGATCAG
 TATCAGATTT ACAATCGGCT AAAAATCGGT GGTCGTTCAA GCGTATCAGA
 AGCATCAAAC TAGTTGAAAA CAATGTCTAG TTTCTTGGGA AAGTGAAAC
 TTAGCGAGTC ACACAACCTC GATGCTGTCA TGTCAAAGCT AGGTGTCTCA
 TGGGCAACTC GACAGATTGG GAACACAGTG ACCCCAACCTG TAACCTTCAC
 AATGGATGGG GATAAAATGA CTATGTTAAC AGAGTCAACT TTCAAAAATC
 TTTCTTGTAC GTTCAAGTTC GCGGAGGAAT TCGATGAAAA AACAAGTGAC
 GGCAGAAATG TCAAGTCAGT TGTGAAAAA AATTCCGAGT CGAAGTTAAC
 GCAAACCTAA GTAGATCCCA AAAACACAAC TGTAATCGTT CGTGAAGTGG
 ATGGTGATAC TATGAAAACG ACTGTGACTG TTGGTGACGT TACTGCCATT
 CGCAATTATA AACGACTATC CTAACGCCTC CAAATGAACA CTGATATTTG
 CTGAGGGTTT TTTTGTAACC GCTTGTATTC CTACTATTTT TATTACAATG
 ATGATAATCA CCGGTGGATA AATTTTGCTA TGCATGTATC GTTCTATATT
 AATTAATCAT TCTCGCATT TCAATAAATAC TGCTTATTGT TGTAIAAAAAA
 AAAAAA

Schistosoma japonicum.

CGGAAATCAC TTCAAAACAA CCAGTTAGTC GGTAATAATG TCTTCTTTCT
 TGGGAAAGTG GAAACTAAGC GAATCACACA ACTTCGATGC TGTATGTCA
 AAGCTCGGTG TCTCGTGGGC GACCCGACAA ATTGGGAACA CAGTGACGCC
 AACTGTCACT TTCACAATGG ATGGGGATAC GATGACCATG CTGACAGAGT
 CGACTTTCAA GAACCTCTCA GTCACGTTCA AATTTGGTGA GGAATTTGAC
 GAGAAAACCA GTGATGGCAG AAGCGTTAAG TCAGTCGTTA CCAAAGATTC
 AGAGTCAAAG ATAACTCACA CTCAAAAGGA TAGTAAGAAC ACAACTGTAA
 TCGTTCGTGA AATAGTAGGT GATACTATGA AAACACTGT AACTGTTCGAT
 GATGTTACGG CTATTCGGAA TTACAAACGA TTGTAACCCC TGCAAACCTGA
 TAGACTGGTC AAATGTTTCT TGAAAGCGCT TGTATTTTCA TTGACATTAT
 TACGAAAATG ACCACCGGTG GACGTATTTG GTTACTCGCG TCATCCTATA
 TTTAATTAAT CAGCTCCACT TTTGGTTCAA TAAACATTGC TTATTATTT

Caenorhabditis elegans.

ATGGCATCTA TGAATGACTT TATCGGACGA TGGAAGTTGG TCCAAACCGA

GAACTTTGAT GAATACATGA AGGAAATCGG AGTCGGGCTC ATCACAAGAA
 AGGCTGCTGC TCATTTGAAG CCAATATTGG AAATCCGATT GGATGGAGAG
 ACATGGAACT TTGATCAATT CTCAACATTC AAGAACACGA AATTGTCTTT
 CAAGTTAGGA GAGGAATTCG TTGAGAACAG TCCAGATGAT CGTACCTACA
 ACTCTCTGTT CACTTTTGAA AACGGAAAAC TGACTIONTCG TCAGAACAAG
 ATCAAGGAGA ATCACAAAAG TTCAGTTCTG ACAACATGGC TTGAAAACGG
 AAAACTCATT CAAACCTATC AATCTGGAGA TGTCATTTGC CGTCGCGAGT
 GGGAGAGAGA ATAA

Fasciola gigantica.

GTTCGTGGAA GTATGGCGAC TCTGAAAATA TGGAAGCTTA TTTGAAAAAG
 CTCGGCATTTC CATCGGACAT GGTGGATAAG ATCCTGAATG CAAAACCAGA
 GTTCACATTC AACTTTGAGG GGAACCAGAT GACTATTAAA ATGGTCTCTT
 CACTGAAAAC TAAGATTACA ACTTTACAT TTGGCGAGGA ATTCAAAGAA
 GAGACCGCGG ATGGCAAGAC GCGATGACC ACAGTTACGA AAGATTCCGA
 AAGCAAAATG ACCCAAGTTA CAACGGGCC GGAATACACC ACTCACGTGG
 TTCGTGAAGT TGTCGGGGAC AAAATGATCG CCACGTGGAC TGTCGGGGAC
 GTGAAAGCCG TGACCACTCT GCTCAAAGCG TGAAATGTGC AAGAT

Fasciola hepatica.

TCCCTCAAAC ACCATGGCCA ATTTTGTGGG TTCGTGGAAG TTGGAACAAT
 CTGAAAACAT GGATGCTGTT TTACAAAAC TCGGAATTA CGTAATCAAA
 AGGAAACTGA TCACAAGTTC CAAACCAGAA ATCACTTTTA CACTGGAGGG
 GAACAAAATG ACCATGAAAA CGGTTTCTGC TCTGAAGACC ACGGTTATCT
 CTTTACATT TGGGGAGGAA TTCAAAGAGG AAACCGCCGA TGGCAGGACG
 GTGATGACCA CGTTTACCAA AGATTCCGAC AGCAAAATAT CCCAGTTCA
 AAAGTGCCCG GAAAACACCA CTCATGTCGT TCGTGAAGTC ACCGGTGGCA
 AAATGATCGC AACTGTAACC GTTGGGGACG TGAAGGCTGT GAACAATTAC
 CACAAAGTAT AAGATTTCCA CGACGGATTT TGAGCATGCC GCGGGGTTAT
 TTCTTCCGAA TGAAACTGAC AAATGAATAT TGGATAAATA TTGAC

Mus musculus.

CCTTTCTCAC CTGGAAGACA GCTCCTCCTC GAAGGTTTAC AAAATGTGTG
 ATGCCTTTGT GGGAACCTGG AAGCTTGTCT CCAGTGAAAA CTTGATGAT
 TACATGAAAG AAGTGGGAGT GGGCTTTGCC ACAAGGAAAG TGGCAGGCAT
 GGCCAAGCCC AACATGATCA TCAGCGTAAA TGGGGATTTG GTCACCATCC
 GGTCAGAGAG TACTTTTAAA AACACCGAGA TTTCTTCAA ACTGGGCGTG
 GAATTCGATG AAATCACCGC AGACGACAGG AAGGTGAAGA GCATCATAAC
 CCTAGATGGC GGGGCCCTGG TGCAGGTGCA GAAGTGGGAT GGAAAGTCGA
 CACAATAAAG AGAAAACGAG ATGGTGACAA GCTGGTGGTG GAATGTGTTA
 TGAAAGGCGT GACTTCCAC AAGAGTTTAT GAAAGGGCAT GAGCCAAAGG
 AAGAGGCTG GATGGAAATT TGCATCAAAC ACTACAATAG TCAGTCGGAT
 TTATTGTTTT TTTTAAAGAT ATGATTTTCC ACTAATAAGC AAGCAATTAA
 TTTTTTCTGA AGATGCATTT TATTGGATAT GGTTATGTTG ATTAAATAAA
 ACCTTTTCTAG ACTT

Sus scrofa.

ATGTGTGATG CATTGTAGG TACCTGGAAA CTTGTCTCCA GTGAAAACCTT

```

TGATGATTAC ATGAAAGAAG TGGGAGTGGG CTTTGCCACC AGGAAGGTGG
CTGGCATGGC CAAACCCAAC CTGATCATCA CTGTGAATGG GGATATGATC
ACCATTAGAT CAGAAAGTAC CTTTAAAAAT ACTGAGATTG CCTTCAAATT
GGGCCAGGAA TTTGATGAAG TCACTGCAGA TGACAGGAAA GTCAAGAGCA
CCATAACCTT AGATGGAGGC GCCCTGGTAC AGGTGCAGAA GTGGGATGGA
AAGACAACCA CCATAAACAG AAAAATAGTA GATGATAAGT TGGTGGTGG
ATGTATCATG AAAGGTGTCA CGGCTACCAG AATTTATGAG AGAGCATAAG
CCAAATTGTA CARAAGTTTG GATCGAACTC TACAACACTC TGTTGGATGT
ATTGTCCCGA CATATGTTGT TATTTTCCAC TAATTAGGAA GCAACTAATT
TTCCCCCAGA CTGATTTTGT TCAATATGCT TGTTAGTTAA ATAAAACTTT
TTAGATTTAA AAAAAAAAAA AAA

```

Homo sapiens.

```

GGAATTCCAG GAGGGTGCAG CTTCTTCTC ACCTTGAAGA ATAATCCTAG
AAAACTCACA AAATGTGTGA TGCTTTTGTG GTTACCTGGA AACTTGTCTC
CAGTGAAAAC TTTGATGATT ATATGAAAAG AGTAGGAGTG GGCTTTGCCA
CCAGGAAAGT GGCTGGCATG GCCAAACCTA ACATGATCAT CAGTGTGAAT
GGGGATGTGA TCACCATTAA ATCTGAAAGT ACCTTTAAAA ATACTGAGAT
TTCCTTCATA CTGGGCCAGG AATTTGACGA AGTCACTGCA GATGACAGGA
AAGTCAAGAG CACCATAACC TTAGATGGGG GTGTCCTGGT ACATGTGCAG
AAATGGGATG GAAAATCAAC CACCATAAAG AGAAAACGAG AGGATGATAA
ACTGGTGGTG GAATGCGTCA TGAAAGGCGT CACTTCCACG AGAGTTTATG
AGAGAGCATA AGCCAAGGGA CGTTGACCTG GACTGAAGTT CGCATTGAAC
TCTACAACAT TCTGTGGGAT ATATTGTTCA AAAAGATATT GTTGTTTTCC
CTGATTTAGC AAGCAAGTAA TTTTCTCCCA AGCTGATTTT ATTCAATATG
GTTACGTTGG TTAAATAACT TTTTTTAGAT TTAG

```

Secuencias de nucleótidos de las proteínas FABP de las diferentes especies utilizadas en los alineamientos.

CLUSTAL W (1.83) Alineamiento de múltiples secuencias.

```

s_mansoni      GTATCAGCTTTGGCGTTTAAATCAATCGCGAATCCTACACCAGAAGATCAGTATCAGATTT 60
s_japonicum    -----
f_gigantica    -----
f_hepatica     -----
c_elegans      -----
s_scrofa       -----
h_sapiens      -----GGAATTC 7
m_musculus     -----
e_granulosus  -----

s_mansoni      ACAATCGGCTAAAAATCGGTGGTCGTTCAAGCGTATCAGAAGCATCAAAGTGTGAAAA 120
s_japonicum    -----CGGAAATCACTTCAAAACAACCAAGTTAGTCGGTAA 35
f_gigantica    -----
f_hepatica     -----TCCCTCAAACA 11
c_elegans      -----ATGGCAT 7
s_scrofa       -----AT 2
h_sapiens      CAGGAGGGTGCAGCTTCCTTCTACCTTGAAGAA---TAATCCTAGAAAACACAAAAAT 64
m_musculus     -----CCTTCTCACCTGGAAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTTTACAAAAAT 45
e_granulosus  -----

s_mansoni      CAATGTCTAGTTTCTTGGGAAAGTGGAAACTTAGCGAGTCACACAACCTTCGATGCTGTCA 180
s_japonicum    TAATGTCTTCTTTCTTGGGAAAGTGGAAACTAAGCGAATCACACAACCTTCGATGCTGTTA 95
f_gigantica    -----GTTCTGTGGAAGTATGGCGACTCTGAAAATATGGAAGCTTAT 42

```

```

f_hepatica      CCATGGCCAAATTTTGTGGGTTCTGTTGAAAGTTGGAACAATCTGAAAACATGGATGCTGTTT 71
c_elegans       CTATGAAATGACTTTATCGGACGATGGAAAGTTGGTCCAAAACCGAGAACTTTGATGAATACA 67
s_scrofa        GTGTGA-TGCATTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAACCTTTGATGATTACA 61
h_sapiens       GTGTGA-TGCATTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCCAGTGAACCTTTGATGATTATA 123
m_musculus      GTGTGA-TGCCTTTTGTGGGAACCTGGAAAGCTTGTCTCCAGTGAACCTTTGATGATTACA 104
e_granulosus    --ATGGAAGGCATTCCTTGGTACCTGGAAAGTGGAGAAAAGTGAGGGTTTCCGAAGATCA 58
                *          * * * * *          *          * * *
                ← 5'  CGTGGAAGMTKGGCGAATC  3' →
                    "FABP-G-F"

s_mansoni       TGTCAAAGCTAGGTGTCTCATGGGCAACTCGACAGATTGGGAACACAGTGACCCCAACTG 240
s_japonicum     TGTCAAAGCTCGGTGTCTCGTGGGCGACCCGACAAATTGGGAACACAGTGACGCCAACTG 155
f_gigantica     TGAAAAAGCTCGGCATTTTCATCGGACATGGTGGATAAGATCCTGAATGCAAAACCGAGT 102
f_hepatica      TCAAAAACTCGGAATTAACGTAATCAAAAAGGAACTGATCACAAAGTTCCAAACCGAGAA 131
c_elegans       TGAAGGAAATCGGAGTGGGCTCATCAAGAAAGGCTGTGCTCATTTGAAGCCAAATAT 127
s_scrofa        TGAAGAAAGTGGGAGTGGGCTTTGGCCACAGGAAAGGTGGCTGGCATGGCCAAACCCAAC 121
h_sapiens       TGAAGAAAGTGGGAGTGGGCTTTGGCCACAGGAAAGTGGCTGGCATGGCCAAACCTAAC 183
m_musculus      TGAAGAAAGTGGGAGTGGGCTTTGGCCACAGGAAAGTGGCAGGCATGGCCAAACCCAAC 164
e_granulosus    TGGAACGCCTTGGGTTGGATTTCTGTCACCTGCAAGATGGGCAATTTGGTTAAACCCAAC 118
                *          * * * * *          *          * * *

s_mansoni       TAACCTTCACAA---TGGATGGGGATAAAAAGACTATGTTAACAGAGTCAACTTTCAAAA 297
s_japonicum     TCACTTTCACAA---TGGATGGGGATACGATGACCATGCTGACAGAGTCGACTTTCAAGA 212
f_gigantica     TCACATTCACAC---TGGAGGGGAACAGATGACTATTAAAATGGTCTCTTTCATGAAAA 159
f_hepatica      TCACTTTACAC---TGGAGGGGAACAAAATGACCATGAAAACGGTTTCTGCTCTGAAGA 188
c_elegans       TGGAAATCCGAT---TGGATGGAGAGACATGGAACCTTTGATCAATTTCTCAACATTCAGA 184
s_scrofa        TGATCATCACTG---TGAATGGGGATATGATCACCATTAGATCAGAAAGTACCTTTAAAA 178
h_sapiens       TGATCATCAGTG---TGAATGGGGATGATGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTAAAA 240
m_musculus      TGATCATCAGCG---TAAATGGGGATTTGGTCACCATCCGGTCAGAGAGTACTTTTAAAA 221
e_granulosus    TCATAGTCACTGATCTGGGTGGCGGCAAGTATAAAATGAGATCGGAGAGCACGTTCAAGA 178
                *          *          *          * *          *          *          * * * *

s_mansoni       ATCTTTCTTGTACGTTCAAGTTCCGGCAGGAATTCGATGAAAAACAAGTGACGGCAGAA 357
s_japonicum     ACCTTCTCAGTCACGTTCAAATTTGGTGAAGGAATTTGACGAGAAAACCGATGATGGCAGAA 272
f_gigantica     CTAAGATTACAACCTTTCACATTTGGCGAGGAATTCAAAGAGAGACCGCGGATGGCAGA 219
f_hepatica      CCAAGTTATCTCTTTTCAATTTGGGAGGAATTCAAAGAGGAAAACCGCGGATGGCAGGA 248
c_elegans       ACACGAAATTTGTCTTTCAAGTTAGGAGAGGAATTCGTTGAGAACAGTCCAGATGATCGTA 244
s_scrofa        ATACTGAGATTGCCCTTCAAATTTGGGCCAGGAATTTGATGAAATCAGTCCAGATGACAGGA 238
h_sapiens       ATACTGAGATTTCCCTTCACTGGGCCAGGAATTTGACGAAATCAGTCCAGATGACAGGA 300
m_musculus      ACACCGAGATTTCCCTTCAAACCTGGGCTGGGAATTCGATGAAATCACCAGACAGCAGGA 281
e_granulosus    CCACCGAATGCTCCTTCAAACCTGGGTGAGAAGTTCAAGGAGGTGACTCCGGATTCACGGC 238
                * * * * *          * *          * * * *          * *          * *

s_mansoni       ATGTCAAGTCAGTTGTTGAAAAAAATTCAGAGTCGAAAGTTAACGCA-AACTCAAGTAGAT 416
s_japonicum     GCGTTAAGTCAGTCGTTACCAAAGATTCAGAGTCAAAGATAACTCA-CACTCAAAAGGAT 331
f_gigantica     CGGCGATGACCACAGTTACGAAAGATTCGGAAAGCAAAATGACCCA-AGTTACAACGGG 278
f_hepatica      CCGTGTATGACCACGTTTACCAAAGATTCGGACAGCAAAAATATCCCA-GGTTCAAAAGTGC 307
c_elegans       CCTCAACTCTCTGTTCACTTTTGA--AAACGAAAACTGACTCATCTCAGACAGCAAGA 301
s_scrofa        AAGTCAAGAGCACCATAACCTTAGAT---GGAGGCGCCCTGGTACA-GGTGCAGAAAGTGG 294
h_sapiens       AAGTCAAGAGCACCATAACCTTAGAT---GGGGGTGTCTGTTGACA-TGTGCAGAAATGG 356
m_musculus      AGGTGAAGAGCATCATAACCTTAGAT---GGCGGGCCCTGGTGA-GGTGCAGAAAGTGG 337
e_granulosus    AGGTGCTTTCATTGATCACAGTGGAG---AATGGGGTGTGAAAGCA-TGAGCAGGATGAC 294
                *          *          *          * *

s_mansoni       CCCAAAAACAACCTGTAAT-CGTTCTGTAAGTGGATGGTGATACTATGAAAAC-GACTG 474
s_japonicum     AGTAAGAACACAACCTGTAAT-CGTTCTGTAAGTGGATGGTGATACTATGAAAAC-TACTG 389
f_gigantica     CCGGAATACACCCTCAGCT-GGTTCTGTAAGTGTGCGGGACAAAATGATCGC-CACGT 336
f_hepatica      CCGGAAAACACCCTCATGT-CGTTCTGTAAGTCAACCGTGGCAAAATGATCGC-AACTG 365
c_elegans       TCAAGGAGAATCAAAAAGTTCAAGTTCTGCAACATGGCTTGAACCGGAAAACTCATTC 361
s_scrofa        GATGGAAGACAACCACCAT-AAAGAGAAAACGAGAGGATGATAAACTGGTGGTGGAAATG 353
h_sapiens       GATGGAAGATCAGC-ACAAT-AAAGAGAAAACGAGATGGTGACAAGCTGGTGGTGGAAATG 415
m_musculus      GATGGAAGATCGAC-ACAAT-AAAGAGAAAACGAGATGGTGACAAGCTGGTGGTGGAAATG 395
e_granulosus    AAAACCAAGGTCACTACAT-TGAACGTGTGGTTGAAGCAATGAGCTGAAAGC-GACC 352
                * *          *          *          *          *          *

s_mansoni       TGACTGTTGGTGACGTTACTGCCATTCGCAATTTAAACGACTATCCTAACGCCTCCAAA 534
s_japonicum     TAACTGTGATGATGTTACGGCTATTCGGAATTCAAAACGATTG---TAAACCCTGCAAA 446
f_gigantica     GGACTGTGGGGACGTGAAAGCCGTGACCACTCTGCTCAAAGCG---TGAATGTGCAAG 393
f_hepatica      TAAACCTTGGGGACGTGAAAGCTGTGCAAAATACCACAAAGTA---TAAAGTTTCCACG 422
c_elegans       AAACCTATCAATCTGGAGATGTCATTTGCCGTCGCGAGTGGGAGAGAGAAATA----- 414
s_scrofa        TA-TCATGAAAGGTGTACGGCTACCGAATTTATGAGAGAGCA---TAAAGCCAAA--- 405
h_sapiens       CG-TCATGAAAGGCTCACTTCCACGAGATTTATGAGAGAGCA---TAAAGCCAAAGGAC 471
m_musculus      TG-TTATGAAAGGCTGACTTCCACAAAGATTTATGAAAGGCA---TGAACCAAAAGGAA 451
e_granulosus    TGAAGTGGATGAAAGTGGTTTGGCTGCGAACCTACTCAAAGGTGGCGTAAAGTGAAG--- 408
                *          *

s_mansoni       TGAACACTGATATTTGTGAGGGTTTTTTTGTAAACCGCTGTATTCTACTATTTTTATT 594

```

```

s_japonicum      CTGATA-----GACTGGTCAAATGTTTCTTGAAAGCGCTGTATTTACAGTTGACATTATT 501
f_gigantica      AT----- 395
f_hepatica       ACGGATTTTGAGCATGCCGCGGGTTATTTCTT-CCGAATGAAACTGACAAATGAATATT 481
c_elegans        -----
s_scrofa         -----TTGTACARAAAGTTTGGATCGAACTCTACAACACTCTGTTGGATGTATTGTCCCG 459
h_sapiens        GTTGACCTGGACTGAAGTTTGCATTGAACTCTACAACATTCTGTGGGATATATTGTTCAA 531
m_musculus       GA-GGCCTGGATGGAAATTTGCATCAAACTACAATAGTCAGTCGGATTTATTGTTTTT 510
e_granulosus     -TTCTCGTTCCCAAGTTGTTTCCCTCCTCTCCATACCACTCCCACATCTTTCTCCTCCTT 467

s_mansoni        ACAATGATGATAATCACCGGTGGAT--AAATTTTGCTATGCATGTATCGTTCTATATT-A 651
s_japonicum      AC---GAAAATGACCACCGGTGGAC--GTATTTGGTTA--CTCGCGTCATCCTATATTTA 554
f_gigantica      -----
f_hepatica       GGATAAAATATTGAC----- 495
c_elegans        -----
s_scrofa         ACATATGTTGTTATTTTCCACTAATTAGGAAGCAACTAAATTTTCCCCCAGACTG-ATTTT 518
h_sapiens        AAAGATATTGTTGTTTTCCCTGATTTAGCAAGCAAGTAAATTTTCTCCCAGCTG-ATTTT 590
m_musculus       TTTAAAGATATGATTTTCCACTAATAAGCAAGCAATTAATTTTCTGAAAGATGCATTTT 570
e_granulosus     TCCAGCTATACTCCTACCTTGATGTGAAGTATAAAGCGCCTTTTTTCTGTGCTAAAAAAA 527

s_mansoni        ATTAATCATTCTCGCATTT----CAATAAATACTGCTTATTGTTGTAIAAAAAAAAAAAAA 707
s_japonicum      ATTAATCAGCTCCACTTTTGGTTCAATAAACATTGCTTATTATTT----- 599
f_gigantica      -----
f_hepatica       -----
c_elegans        -----
s_scrofa         GTTCAATATGCTT--GTTAGTTAAATAAAAC-TTTTTAGATTTAAAAAAAAAAAAAAAA-- 573
h_sapiens        ATTCAATATGGTTACGTTGGTTAAATAAAGTTT-TTTTTAGATTTAG----- 634
m_musculus       ATTTGATATGGTTATGTTGATTAATAAAGCTTTTTTAGACTT----- 613
e_granulosus     AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 557

```

* Coincidencia de nucleótidos.

Nombres completos de las especies: m_musculus = *Mus musculus*; h_sapiens = *Homo sapiens*; s_scrofa = *Sus scrofa*; c_elegans = *Caenorhabditis elegans*; e_granulosus = *Echinococcus granulosus*; s_mansoni = *Schistosoma mansoni*; s_japonicum = *Schistosoma japonicum*; f_gigantica = *Fasciola gigantica*; f_hepatica = *Fasciola hepatica*.

De los alineamientos podemos deducir que no existen regiones especialmente conservadas, aunque algunas porciones presentan un número menor de diferencias que otras. Puesto que la secuencia consenso deducida de los alineamientos no es apropiada para mostrar estos hechos, a continuación se han seleccionado las regiones que podríamos considerar más conservadas, en las que la frecuencia con que se presenta cada aminoácido o nucleótido se ha indicado con un código de color.

- Fragmento de la secuencia consenso en aminoácidos:

-TM-SESTFKNTEISFKLGEFDE-TADDR-VKSTITKDS-

- Fragmento de la secuencia consenso en nucleótidos:

“FABP-G-F”

➔ 5` CGTGGAAGMTKGGCGAATC 3` ➔

5` ATG--TG--TTTGTGGGTACGTGGAAG-TTC-C-A-TCTGAAAAGTT-

GATGATT--ATGAAAGAACT-GGAGT-G--TT-GCCAC-AGGAA--TGG--
----CA--GC-AAACCAA--T-A---TCACA----TGGATGGGGA^{3'}

En ambas secuencias, el **color azul** identifica los residuos que se mantienen constantes en su posición en todas las especies comparadas. El **color verde** corresponde a los residuos más comunes en sus respectivas posiciones. El color negro corresponde a posiciones donde el residuo existente está en cierta mayoría respecto a los demás. Y los guiones (-) corresponden a lugares donde no existe ningún consenso o base claramente más probable en esa posición.

Debido a la baja conservación de este gen, y al disponer tan solo de un fragmento excesivamente corto (145 pb) para el diseño de dos oligonucleótidos que resultasen de utilidad para la amplificación de esta porción de la FABP de *Giardia*, abordamos el problema siguiendo una estrategia distinta. Esta consistió en el diseño de un único oligonucleótido dentro de la región anteriormente mencionada, que diera especificidad a una reacción 3'RACE, y que pudiese utilizarse junto con un oligo-T (oligoT-3'RACE) en reacciones de RT-PCR. No obstante, la temperatura óptima de apareamiento de un oligonucleótido con muchas repeticiones (en este caso un poli-T) es difícil de determinar, y más aún si el oligonucleótido debe ser compatible con el que se diseñase dentro de la región conservada. Se planteó así la posibilidad de resolver éste problema mediante la adición de cierto número de nucleótidos al extremo 3' del poli-T. La secuencia de esta cola en 5' es arbitraria, pero puede elegirse de manera que sea compatible con el oligonucleótido específico de la FABP, en el sentido de no formar dímeros entre sí, y tener una temperatura de fusión (T_m) similar.

El oligonucleótido específico, diseñado en la región conservada, al que hemos denominado FABP-G-F, incluyó dos posiciones degeneradas. En su diseño se procuró una estabilidad baja en 3' para darle la mayor especificidad posible, y que los residuos degenerados quedasen en posiciones centrales para garantizar un buen apareamiento de los extremos.

En su conjunto, la reacción consiste en una retrotranscripción, utilizando el oligo-T-3'RACE como cebador, seguida de una PCR con los oligonucleótidos FABP-G-F y 3'RACE-R, según se describe en el Material y Métodos.

Se realizaron diversos controles de la amplificación de la FABP mediante RT-PCR con objeto, no solo de comprobar la propia amplificación, sino también de verificar la calidad del cDNA y descartar la contaminación por

DNA genómico. Así, se utilizó un gen de expresión constitutiva, la Glucosa-6P-Isomerasa como control de la amplificación. La eficacia de esta pareja de cebadores para la amplificación de este gen fue comprobada sobre DNA genómico. La calidad del cDNA retrotranscrito a partir del cebador oligoT-3'RACE fue comprobada mediante su utilización como molde en una reacción de amplificación del fragmento de la Glucosa-6P-Isomerasa (G6PI). La ausencia de contaminación en las muestras de RNA con DNA genómico, se comprobó intentando amplificar el fragmento de la G6PI utilizando éste RNA como molde. La amplificación debería fallar a no ser que hubiese presencia de DNA genómico, ya que el RNA no actúa como molde para la polimerasa Taq. Finalmente, se realizó una amplificación con los oligonucleótidos FABP-G-F y 3'RACE-R. El primero de ellos daría especificidad a la reacción al unirse a la región conservada del mRNA de la FABP, y el segundo hibridaría con todos los extremos 3' que contienen el oligoT-3'RACE.

FIGURA: 20.a.



Figura 20.a: “Test” de amplificación de un fragmento de cDNA de la FABP de *Giardia lamblia*. 1) Marcador de peso molecular; 2-5) Amplificación de la G6PI utilizando como molde 2) cDNA, 3) DNA genómico 4) Sin molde (Blanco), y 5) RNA sin retrotranscribir. 6) 3'RACE de la FABP.

En la figura 20.b, se muestra mas detalladamente la amplificación obtenida cuando se utilizan las mismas condiciones descritas para el caso n° 6) de la figura 20.a.

FIGURA: 20.b.



Figura 20.b: Amplificación del fragmento de cDNA perteneciente a la FABP en *Giardia lamblia*. 1) 3'RACE de la FABP. 2) Control negativo sin molde (Blanco).

Una vez descartada la posibilidad de amplificación directa de la FABP a partir de una muestra heterogénea de cDNA, el siguiente paso consistió en la construcción de una genoteca de expresión a partir de la cual se pudiesen aislar éste u otros genes o incluso fragmentos de los mismos, que pudiesen ser reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de los organismos inmunizados o en la saliva de individuos parasitados.

En primer lugar se comprobó el estado de los mRNA que se iban a utilizar en la construcción de la genoteca, tal y como se describe en el siguiente apartado.

3.8 Comprobación del estado de los mRNA utilizados en la construcción de la genoteca.

Se purificó los mRNA de un cultivo fresco de trofozoítos de *Giardia*, y su estado se comprobó mediante la realización de una electroforesis en un gel

de agarosa desnaturalizante. La figura 21 muestra los resultados de éste análisis.

FIGURA: 21.

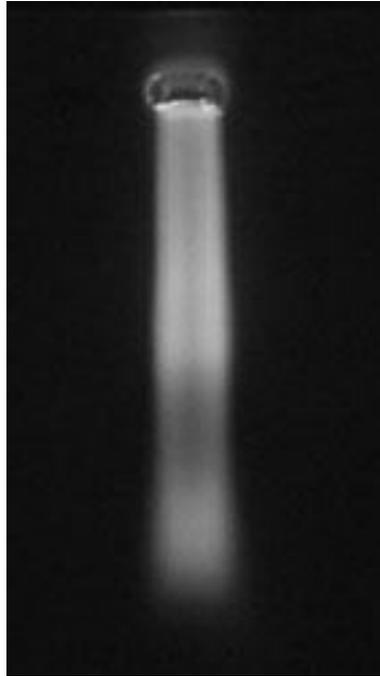


Figura 21: Análisis visual de los mRNA extraídos de los cultivos de *Giardia*.

Aunque se carece del marcador interno que supone la presencia de los RNA ribosómicos, podemos observar en ésta figura que disponemos de fragmentos de mRNA de elevado peso molecular, aptos por tanto para la síntesis de cDNA.

3.9 Síntesis del cDNA.

La eficacia de los pasos a seguir en la síntesis del cDNA, se comprobó extrayendo una alícuota de cada reacción, en la que se incorporó Dioxigenina-11-dUTP. Se tomó una alícuota tras la síntesis de la primera hebra, y otra tras la síntesis de la segunda. Ambas muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel desnaturalizante, y transferidas posteriormente a un filtro de nylon mediante la transferencia alcalina descrita por Southern blok. Tras el revelado del filtro mediante el uso del método de Detección Colorimétrica con NBT y X-Phosfato en el que se usa anti-digoxigenin-AP, pudimos observar que la síntesis de las dos hebras se había realizado correctamente. Fig 22.

FIGURA: 22.



- A: Control negativo.
 B: Síntesis de la primera hebra.
 C: Síntesis de la segunda hebra.

3.10 Comprobación de la existencia de inserto en el interior de los plásmidos.

Tras el fraccionamiento del cDNA, su ligado con el vector, y la transformación de las bacterias, se procedió a comprobar la presencia de insertos en una muestra aleatoria de varios clones. Para ello se seleccionaron 4 clones que se cultivaron en medio líquido y a partir de los cuales se realizaron minipreparaciones de plásmidos (Fig 23.a), que fueron posteriormente digeridas con las enzimas de restricción Hind III y Eco R I (Figura 23.b)

FIGURA: 23.a.

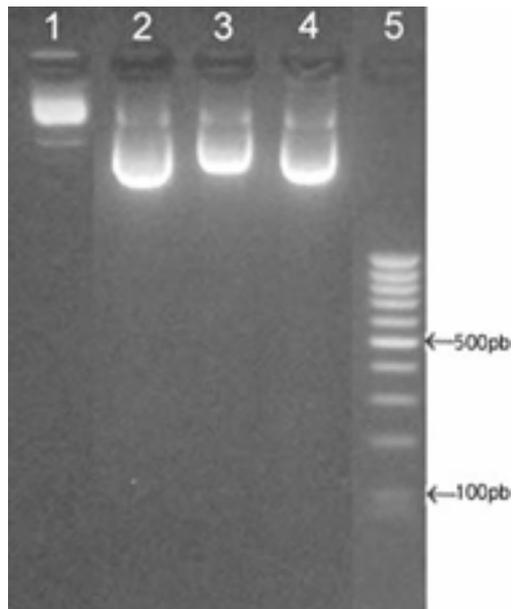


Figura 23.a: Electroforesis de DNA plasmídico extraído de 4 clones seleccionados al azar (1, 2, 3 y 4). Nótese la diferencia de peso molecular entre ellos. (5) Marcador de peso molecular.

FIGURA: 23.b.

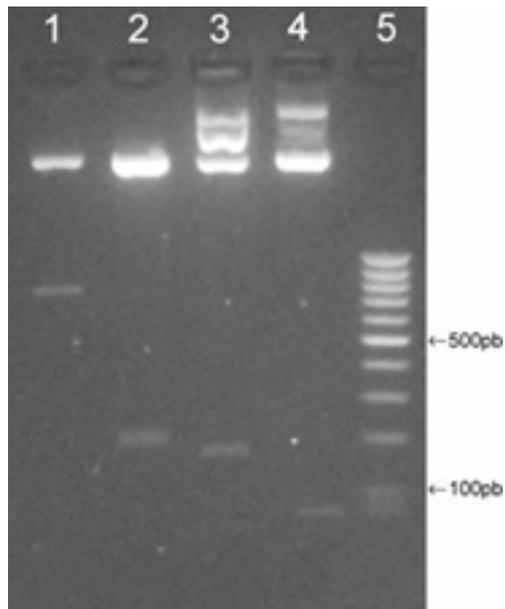


Figura 23.b: Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos digeridos (1-4). Nótese los 4 insertos de diferentes pesos moleculares. Las muestras 3 y 4 muestran una digestión parcial, de ahí que se observen varias bandas correspondientes al vector. (5) Marcador de peso molecular.

3.11 Rastreo de la genoteca de expresión mediante anticuerpos.

En paralelo a la construcción de la genoteca de expresión, procedimos a inmunizar con proteína FABP a una serie de ratones, con el objeto de obtener anti-sueros para el rastreo inmunológico.

Análisis mediante ELISA a las muestras de suero extraídas durante el proceso de inmunización, demostraron el aumento del título de los mismos a lo largo del periodo de 6 semanas durante las cuales se prolongó el protocolo de inmunización, apareciendo reflejados los resultados en la figura 24.a.

FIGURA: 24.a.

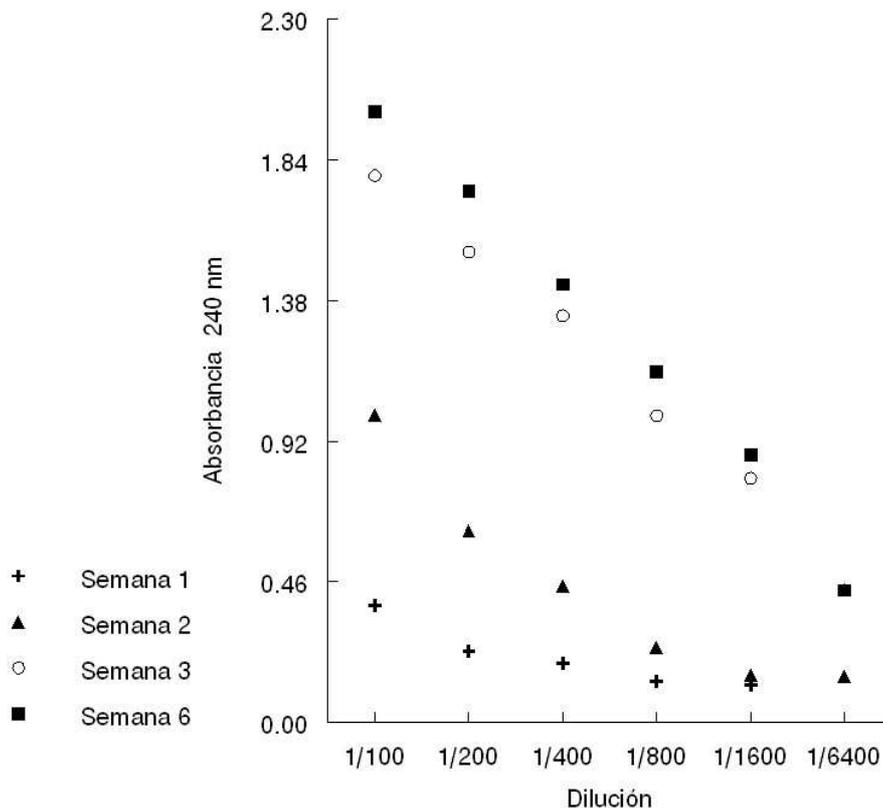


Figura 24.a: Valores de absorbancia a 240nm, de las diferentes diluciones de los inmunosueros, a lo largo del período de 6 semanas de inmunización. Nótese el incremento en el título de los sueros.

El rastreo de la genoteca con éstos sueros reveló la presencia de varios clones que presentaban reacción positiva frente a los anticuerpos presente en los mismos sueros, tal y como se puede observar en el ejemplo de la figura 24.b.

FIGURA: 24.b.

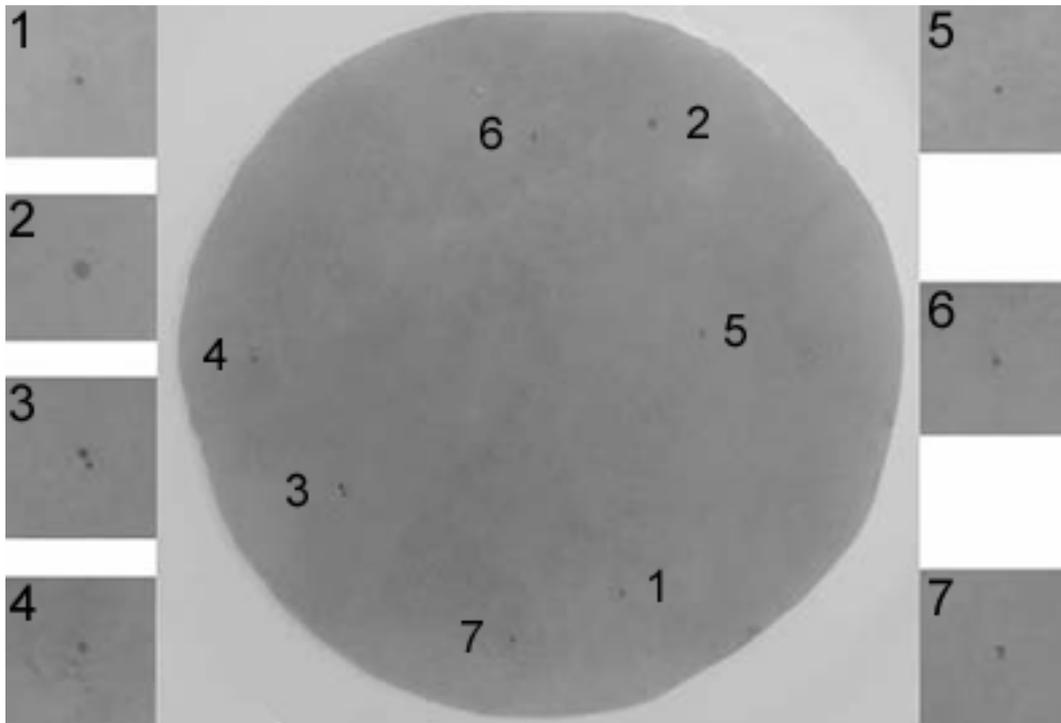


Figura 24.b: Membrana de nitrocelulosa que muestra como ejemplo 7 clones con posible reacción positiva frente a los anticuerpos de los sueros utilizados.

3.12 Secuenciación de los clones positivos.

Los clones que dieron una señal positiva fueron rutinariamente secuenciados, siendo sometidas las secuencias obtenidas a un primer rastreo en las bases de datos de DNA mediante BLAST. Entre las secuencias analizadas, solo una fue objeto de un estudio más profundo, por su similitud con otras proteínas conocidas de estas bases de datos.

El clon analizado fue numerado basándonos en un código que incluía el número del rastreo y el número de clon, siendo esta misma nomenclatura la que se siguió utilizando para la secuencia aislada de este. Así, la secuencia analizada se denominó GCR3-4 (*Giardia*. Clon. Rastreo 3°. El n°4), y se muestra a continuación.

FIGURA: 25.

GCR3-4: (5'→3')

GTCCAATCGT	TTCTGGGAAG	ACATAAGGGA	TGGCAGGGAA	CGCAATAGTT
CCCNAANTNG	GACCTTGCAA	CCNNTTATCCT	TTTGGGGAGC	AAACCCCAGA
GCAAATAANC	CGCAGAGGAT	GCTGTCCACG	GAACACTTCA	GGACTTAGCA
AAGTTTCGAT	CGGTCGAGAT	GGCAAGGCTT	GAGNCCGGAA	AGGCGAGTGC
AGAATCGTCG	GAGCAAAGAA	AGGAGAGAGG	TGGGATGTTC	ACCCGCATGA
TATCAGTGAT	AAGGGGTGCC	TTTGGACGGA	GAAGTCGGGC	AATTCTCTCT
GTAGAATCCC	AAGGAAAGTC	ACTCATTCTG	TCCTCTACGC	GCCCCCAGGC
CATCCCCACC	ACGACCTCCG	AAAAGACAGA	CCGGGTCGCT	CACACTCTTG
GAATTTCTAG	CCTGCGACAG	TAGTCGGCTG	GGCTCAGTTT	ACTTTAACTT
TGATCTCTGC	ATGCCCAGCC	ATTTACCTGA	GGCGGCGCGC	TTCACGCTCC
GACTCCATCA	ACACAAGGAT	GTCATCCTTC	CTAACCGGCC	CTATAACGTT
ACGGATGATC	TGGCGCTTCT	CCCCTGTCAT	GAATTCAACC	TTCACCTGTG
TTATTCCTCC	GCGGGAGCTC	GTCCTTCCCA	GGACTTCGAT	CACACGCGCA
TTTATTGGCT	CAGGCATTGC	TAGTTCGAGA	GGGTGTCTTT	TTGAGTTACA
AAAGTGAAT	TAATATCAA	AAAAAAAAAA	AAAA	

Figura 25: Secuencia de nucleótidos perteneciente al inserto del clon seleccionado.

A continuación se muestra la traducción en aminoácidos de las 6 posibles pautas de lectura de la secuencia anterior.

GCR3-4:

>_1

VQSFLGRHKGWQGTQ*FPXXDLATXILLGSKPQSK*XAEDAVHGTLQDLAKFRSVEMARL
EXGKASAESSEQRKERGGMFTRMISVIRGAFGRRSRALLSVESQKSLILSSTRPQAIPT
TTSEKTDRAVHTLGISSLRQ*SAGLSLL*L*SLHAQPFT*GGALHAPTPSTQGCHPS*PA
L*RYG*SGASPLS*IQSPVFLFRGSSSFPLGRSHAHLLAQALLVREGVFLSYKSEINI

>_2

SNRFWEDIRDGRERNSSQWTLQPYPFGEQTPEQITAEDAVHGTLQDLAKFRSVEMARLEPERRV
QNRRSKERREVGCSA*YQ**GVPLDGEVGVQFSL*NPKESHSHFCPLRAPRPSPPRPPKRQTGSL
TLLEFLACDSSRLGSVYFNFDLCMPSHLPEAARFTLRLHQHKDVLNRPYNVTDDLALLPCHE
FNLHLCSYSSAGARPSQDFDHTRIYWLRHC*FERVSF*VTKVKLIS

>_3

PIVSGKT*GMAGNAIVPXXGPCNXYPFGEQTPEQIXRRGCCPRNTSGLSKVSIGRDGKA*
XRKGECRIVGAKKGERWDVHPHDISDKGCLWTEKSGNSLCRIPRKVTHSVLYAPPGHPH
DLRKDRPGRSHSNWF*PATVVGWAQFTLTLISACPAIYLRRRASRSDSINTRMSSFLTGP
ITLRMIWRFSPVMNSTFTCVIPPRELVLPRTSITRAFIGSGIASSRGCLFELQK*N*Y

>_4

DINFTFVTQKDTLSN*QCLSQ*MRV*SKSWEGRAPAE*HR*RLNS*QGRSARSSVTL*G
RLGRMTSLC*WSRSVKRAASGKWLGMQRSLK*TEPSRLLSQARNKSVSDPVCLFGGRG
GDGLGARRGQNE*LSLGFYRENCPTSPSKGTPYH*YHAGEHPTSLLSLLRRFCTRLSGLK
PCHLDRSKLC*VLKCSVDSILCGLFALGFAPQKDXGCKVXXXELLRSLPSLMSSQKRLD

>_5

Y*FHFCSNKRHPLELAMPEPINARVIEVLGRTSSRGGITQVKVEFMTGEKRQIIRNVIGP
VRKDDILVLMESEREARRLR*MAGHAEIKVKVN*AQPTTVAG*KFQECERPGLSFRRSWW
GWPGGA*RT*VTFLGILQRELPDFSVQRHPLSLISCG*TSHLSPFFAPTILHSPFRXQA
LPSRPIETLLSPEVFRGQHPLRXICSGVCSPKG*XLQGPXXGTIAFPAIPYVFPETIGX

>_6

ILISLL*LKKTPSRTSNA*ANKCACDRSPGKDELPRRNNTGEG*IHDRGEAPDHP*RYRA
G*EG*HPCVDGVGA*SAPPQVNGWACRDQS*SKLSPADYCRRLIIPRV*ATRSVFSEVVV
GMAWGRVEDRMSDFPWDSTERIARLLRPKAPLITDIMRVNIPPLSFLCSDDSAFAFPXSS
LAISTDRNFAKS*SVPWTASSAXYLLWGLLPKRIXVARSXXGNVCPCHPLCLPRNDWT

(*) Significa codón de terminación.

En la secuencia CGR3-4, la segunda pauta de lectura es la que presenta la porción de mayor tamaño hasta llegar al primer codón de terminación, además de presentar homologías reales con proteínas ya secuenciadas, mientras que en el resto de pautas de lectura presentan numerosos codones de stop muy al comienzo de la secuencia, siendo los fragmentos resultantes demasiado pequeños como para que representen realmente una pauta de lectura funcional.

La búsqueda de homologías mediante BLAST en SwissProt reveló una alta homología con dos proteínas de *G. lamblia* de función desconocida. Una primera homología del 53% y una segunda del 100%:

UniRef100_Q7R355	GLP_554_41472_36361 [<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803]	1703 AA alineamiento
<p>Cuenta = 68.6 bits (166), Esperado = 1e-10 Identidad = 41/76 (53%), Positivo = 47/76 (61%)</p> <p>Comparada:</p> <p>1 SNRFWEDIRDGREERNSSQWTLQPYPFGEQTPEQITAEDAVHGTLQDLAKFRSVEMARLEP 60 SNRF EDIR+ L PEQ+TAEDAVHGTLQDLAKFRSVEMARLE</p> <p>1566 SNRFLEDIRNAANAIVPNSDLATLILLGANPEQLTAEDAVHGTLQDLAKFRSVEMARLE- 1624</p> <p>Sujeto:</p> <p>Comparada:61 ERRVQNRRSKERREVG 76 + S++R+E G</p> <p>Sujeto: 1625 AGKASAESSEQRKERG 1640</p>		

UniRef100_Q7R357	GLP_554_36323_36111 [<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803]	70 AA alineamiento
<p>Cuenta = 157 bits (396), Esperado = 3e-37 Identidad = 70/70 (100%), Positivo = 70/70 (100%)</p> <p>Comparada:</p> <p>148 MPShLPEAARFTLRLHQHKDVILPNRPYNVTDDLALLPCHEFNHLHCYSSAGARPSQDFD 207 MPShLPEAARFTLRLHQHKDVILPNRPYNVTDDLALLPCHEFNHLHCYSSAGARPSQDFD</p> <p>1 MPShLPEAARFTLRLHQHKDVILPNRPYNVTDDLALLPCHEFNHLHCYSSAGARPSQDFD 60</p> <p>Sujeto:</p> <p>Comparada:208 HTRIYWLRHC 217 HTRIYWLRHC</p> <p>Sujeto: 61 HTRIYWLRHC 70</p>		

La existencia de dos zonas separadas del clon que presentan zonas de homología con otras proteínas de *Giardia lamblia*, nos hizo comprobar la posibilidad de que el cDNA de GCR3-4 procediese de un mRNA sin madurar o parcialmente maduro. La búsqueda de lugares de corte de

intrones mediante NetGene2 arrojó los siguientes resultados utilizando las reglas para humanos:

***** NetGene2 v. 2.4 *****

La secuencia tiene la siguiente composición:

Length: 734 nucleotides.
26.0% A, 26.0% C, 24.1% G, 23.0% T, 0.8% X, 50.1% G+C

Donor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
193		1	+	0.71	GXCCGAAAG	^	GCGAGTGCAG	

Donor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
476		259		2	-	0.94	GCCGCCTCAG	^	GTAATGGCT	H

Acceptor splice sites, direct strand

pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
141		0	+	0.07	AACACTTCAG	^	GACTTAGCAA	
148		1	+	0.07	CAGGACTTAG	^	CAAAGTTTCG	
348		0	+	0.49	GCGCCCCCAG	^	GCCATCCCCA	
468		2	+	0.83	GCATGCCCAG	^	CCATTTACCT	
481		0	+	0.20	TTTACCTGAG	^	GCGGCGCGCT	
631		0	+	0.33	TCCTTCCAG	^	GACTTCGATC	

Acceptor splice sites, complement strand

pos	3'→5'	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
634		101		1	-	0.18	GTGATCGAAG	^	TCCTGGGAAG	
624		111		2	-	0.14	TCCTGGGAAG	^	GACGAGCTCC	
618		117		2	-	0.07	GAAGGACGAG	^	CTCCCGCGGA	
574		161		1	-	0.07	TTTATGACAG	^	GGGAGAAGCG	
569		166		0	-	0.07	GACAGGGGAG	^	AAGCGCCAGA	
366		369		0	-	0.25	CTTTTCGGAG	^	GTCGTGGTGG	

CUTOFF values used for confidence:

Highly confident donor sites (H):	95.0 %
Nearly all true donor sites:	50.0 %
Highly confident acceptor sites (H):	95.0 %
Nearly all true acceptor sites:	20.0 %

El mismo análisis utilizando las reglas para *C. elegans* proporcionó los siguientes resultados:

***** NetGene2 v. 2.4 *****

La secuencia tiene la siguiente composición:

Length: 734 nucleotides.

26.0% A, 26.0% C, 24.1% G, 23.0% T, 0.8% X, 50.1% G+C

Donor splice sites, direct strand

No donor site predictions above threshold.

Donor splice sites, complement strand

No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand

pos 5'->3' phase strand confidence 5' intron exon 3'
468 2 + 0.86 GCATGCCCAG^CCATTTACCT

Acceptor splice sites, complement strand

pos 3'->5' pos 5'->3' phase strand confidence 5' intron exon 3'
574 161 1 - 0.56 TTCATGACAG^GGGAGAAGCG

CUTOFF values used for confidence:

Highly confident donor sites (H): 95.0 %
Nearly all true donor sites: 50.0 %

Highly confident acceptor sites (H): 95.0 %
Nearly all true acceptor sites: 20.0 %

El análisis del potencial codificante de la secuencia de GCR3-4 mediante éste mismo programa reveló precisamente dos regiones con alto potencial, que flanquean a una región con potencial prácticamente nulo, según las

reglas para humanos, o bastante disminuido si se aplican las de *C. elegans*, tal y como se observa en las siguientes gráficas.

FIGURA: 25.b.

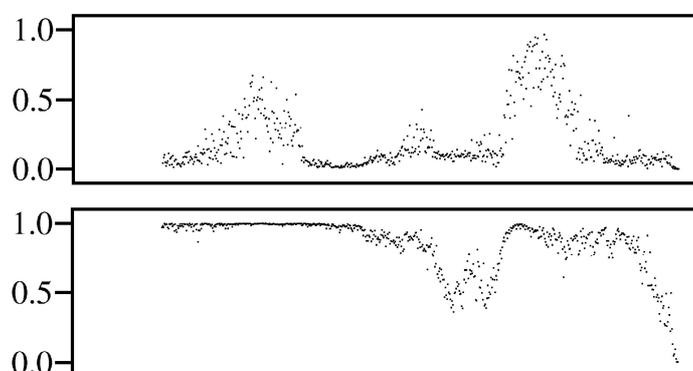


Figura 25.b. Representación del potencial codificante de GCR3-4 según los resultados obtenidos con NetGene2. En la parte superior se representan los resultados de aplicar las reglas correspondientes a humanos, en la parte inferior las de *C. elegans*. Nótese la disminución de potencial codificante en una porción central de la secuencia, especialmente significativa en el caso de las reglas para humanos.

3.13 Análisis mediante electroforesis de las proteínas del clon positivo GCR3-4.

La figura 26, muestra el resultado de la electroforesis SDS PAGE, en condiciones no reductoras, de un gel de Poliacrilamida al 20% (Phast Gel Homogeneous 20), en donde han corrido los sobrenadantes resultantes de la lisis de los clones positivos, tras su centrifugación y posterior tratamiento en las diferentes cromatografías, una vez que los clones fueron inducidos con IPTG.

En el gel, se observa como dependiendo del tipo de tratamiento de limpieza al que es sometida cada una de las muestras obtenidas de la lisis de las bacterias, las proteínas se distribuyen mejor o peor, en forma de bandas, a lo largo de cada carril, de modo que utilizamos para las siguientes pruebas inmunológicas aquellas muestras que tengan una mejor distribución de sus bandas, mostrando todo el rango de proteínas de los clones analizados, sirviendo de referencia para conocer cuales son las bandas que presentan respuesta inmunológica, y si se puede demostrar la aparición de falsos positivos causantes de la elección durante el rastreo del correspondiente clon identificado.

FIGURA: 26.

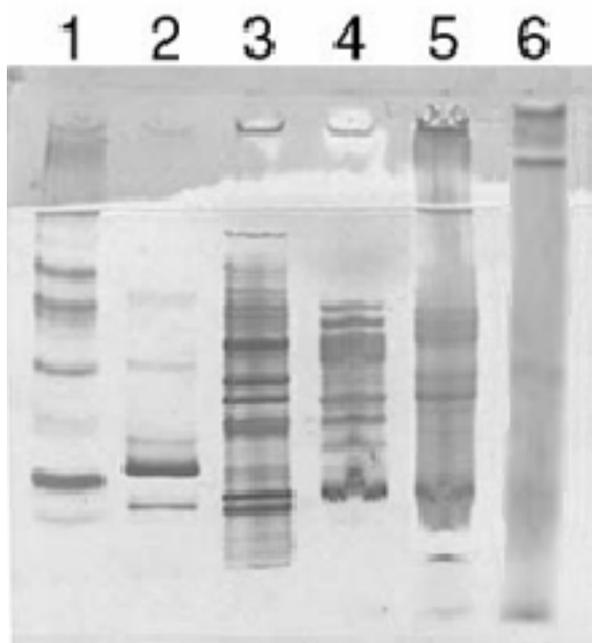


Figura 26: Gel de identificación de las diferentes bandas de cada una de las muestras analizadas: 1° Proteína marcadora. 2° Sobrenadante del dializado-Liofilizado, resuspendido en agua, y limpiado por el Kit SDS-PAGE Clean-Up Kit de Amersham Biosciences, para la eliminación de lípidos. 3° El precipitado de lo dializado, precipitado con acetona y resuspendido en PBS. 4° El sobrenadante de lo dializado, precipitado con acetona y resuspendido en PBS. 5° Lisado de bacterias pasado por Ac. Butírico y tratado con NaOH. 6° FABP de *Giardia*.

A la vista de los diferentes geles realizados, se tomó la decisión de que la mejor distribución de bandas de todas las pruebas realizadas se producía en este gel, por lo que se utilizó esta misma distribución de muestras para la realización del resto de pruebas inmunológicas, puesto que como se observa claramente en el gel, no hay una muestra que presente todo el patrón de bandas completo.

3.14 Análisis mediante westernblot de las proteínas del clon positivo GCR3-4, detectadas con los sueros de los ratones inmunizados con las FABP.

La figura 27, muestra el inmunoblot realizado tras la transferencia de las proteínas del clon positivo GCR3-4, que han corrido en el gel mostrado en el apartado anterior.

En esta membrana, se puede observar como en el carril número 6, en donde han corrido las proteínas LBP purificadas de *Giardia*, aparecen los mayores signos de respuesta frente a los sueros de los ratones inmunizados con estas proteínas. En los restantes carriles, en donde se han transferido las proteínas del clon positivo, se observa como aparece una banda que da respuesta positiva a los sueros de los ratones, por lo que se puede afirmar que esta banda muestra por lo menos reacción cruzada con una LBP.

FIGURA: 27.

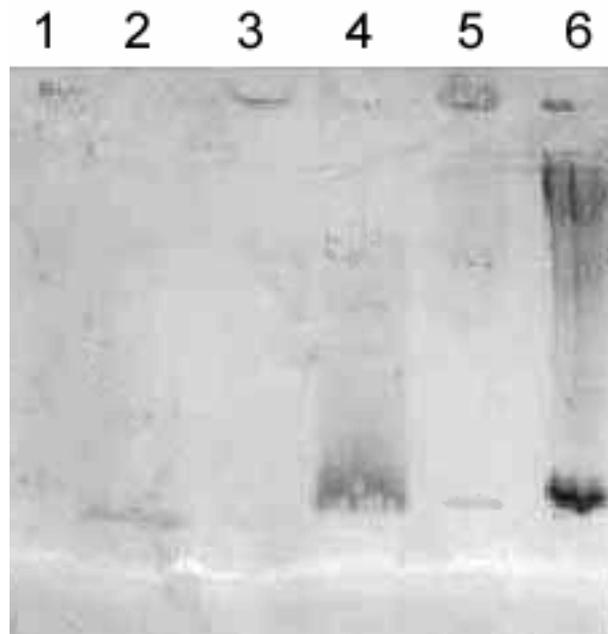


Figura 3.14: Membrana de nitrocelulosa revelada con los inmunosueros, en la que previamente se había transferido el siguiente patrón de bandas: 1° Proteínas marcadoras. 2° Sobrenadante del dializado-Liofilizado, resuspendido en agua y limpiado por el Kit SDS-PAGE Clean-Up Kit de Amersham Biosciences, para la eliminación de lípidos. 3° El precipitado de lo dializado, precipitado con acetona, y resuspendido en PBS. 4° El sobrenadante de lo dializado, precipitado con acetona y resuspendido en PBS. 5° Lisado de bacterias pasado por Ac. Butírico y tratado con NaOH. 6° FABP de *Giardia*.

3.15 Análisis mediante westernblot de las proteínas del clon positivo GCR3-4, detectadas con las salivas de personas afectadas por Giardiosis.

La figura 28, muestra la imagen de un “westernblot” con la misma distribución de muestras que la figura 26.

Para la inmunodetección se utilizó, en este caso, salivas de pacientes afectados por Giardiosis. La imagen muestra la reacción positiva en el carril de control con FABP purificadas de *Giardia* (número 6). En el resto de las muestras, los resultados son similares a los obtenidos con los sueros de los ratones inmunizados con las FABP, que se muestran en el apartado anterior.

FIGURA: 28.

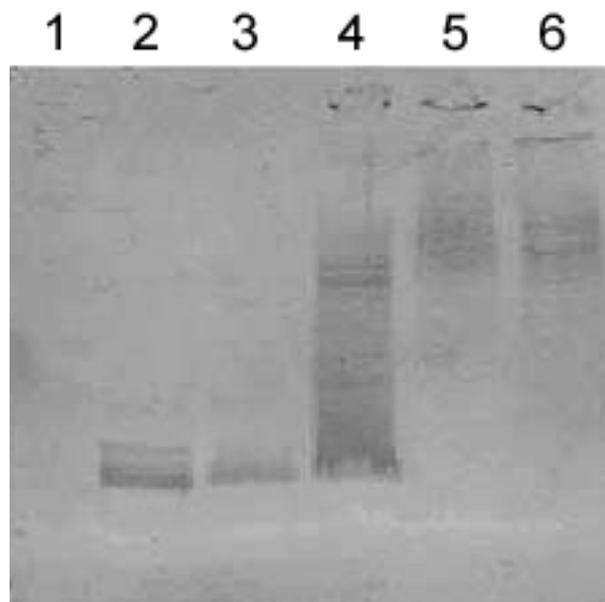


Figura 28: Identificación de los diferentes carriles: 1° Proteínas marcadoras. 2° Sobrenadante del dializado-Liofilizado, resuspendido en agua y limpiado por el Kit SDS-PAGE Clean-Up Kit de Amersham Biosciences, para la eliminación de lípidos. 3° El precipitado de lo dializado, precipitado con acetona, y resuspendido en PBS. 4° El sobrenadante de lo dializado, precipitado con acetona y resuspendido en PBS. 5° Lisado de bacterias pasado por Ac. Butírico y tratado con NaOH. 6° FABP de *Giardia*.

4 DISCUSIÓN.

Como ya se ha indicado anteriormente en la introducción, *Giardia lamblia* es el agente etiológico de la enfermedad gastrointestinal denominada

giardiosis, que afecta fundamentalmente al intestino delgado de una serie de vertebrados, entre los que se encuentra el hombre. Actualmente dicha enfermedad es considerada como la parasitosis más extendida producida por protozoos parásitos. La enfermedad es especialmente grave en niños, en los que se la relaciona con retrasos en el crecimiento, pérdida de apetito, náuseas, flatulencia, dolor abdominal, y diarreas que muestran ausencia de exudados celulares y sangre (Korman y col., 1990; Farthing y col., 1986a).

En la infección crónica, la malabsorción de grasas y la esteatorrea constituyen los efectos más graves de la infección, que se acentúan con la pérdida significativa de nutrientes y la carencia de vitamina A, ya que esta vitamina junto con sus precursores los carotenoides, deben ser absorbidos junto a los lípidos (Mandour y col., 1984).

En definitiva, la presencia de *Giardia* en el intestino condiciona una deficiente ingestión de grasas, proteínas y poliazúcares, induciendo sintomatologías similares a la pancreatitis, celiaquía o incompatibilidad con la lactosa (Groll A. 1977).

Los mecanismos por los que *Giardia* causa diarrea y malabsorción, son multifactoriales (Katelaris y Farthing, 1992). Se ha sugerido el simple efecto mecánico al tapizar los trofozoítos el duodeno, pero la enorme superficie del intestino delgado del hospedador y la poca masa metabólica del parásito, hacen de esta hipótesis poco plausible. Estas anomalías pueden estar relacionadas con la respuesta inflamatoria de la mucosa como consecuencia de la adhesión mecánica o hidrodinámica del trofozoíto, la acción de las lectinas del protozoo (Muller y von Allmen, 2005), la alteración de las sales biliares, la inhibición de la bomba de protones (Kader y col., 1998), la presencia de permeasas o la presencia de inhibidores enzimáticos que alteren el proceso digestivo (Katelaris y col., 1991; Nain y col., 1991).

La infección se inicia con la ingestión de los quistes. Los trofozoítos se liberan en el duodeno, donde comienzan a multiplicarse en un ambiente con un pH comprendido entre 6.8 y 7.2, una baja tensión de oxígeno, potencial Redox bajo y la presencia de tensoactivos como consecuencia de las sales biliares (Keister, 1983; Farthing y col., 1983).

Los trofozoítos de *Giardia lamblia* no penetran en la mucosa como ocurre con *Giardia muris*, donde se les puede encontrar en los tejidos profundos del intestino del ratón al que parasitan (Owen RL y col., 1981). Los trofozoítos se establecen en la superficie de las vellosidades del duodeno, donde se fijan mediante el disco adhesivo con la ayuda de lectinas como la α -1 giardina (Weiland y col., 2003). Estas lectinas son altamente inmunogénicas, y alterarían junto con la presión negativa del batir de los flagelos, la topología de las microvellosidades del enterocito.

Estudios recientes (Chen y col., 1995), indican la existencia de una proteína rica en cisteína denominada crp136, cuyo gen, curiosamente, tiene una homología del 57% con el gen de una toxina de serpiente, llamada sarafotoxina, péptido tóxico cuya administración induce una sintomatología parecida a la producida por la parasitación por *Giardia*.

Cuando los trofozoítos de *Giardia* descienden hasta la última parte del intestino delgado- primera parte del intestino grueso, lugar donde el contenido de lípidos disminuye, se produce el fenómeno de enquistamiento. El protozoo sufre un proceso de bicariocinesis, comienzan a aparecer vesículas que darán origen al exoquiste, y los quistes ya maduros salen al exterior con el material fecal.

El análisis de las secuencias de los rRNA, la casi inexistencia de intrones en su DNA, la ausencia de mitocondrias, de aparato de Golgi y de peroxisomas, junto con la carencia de reproducción sexual, tienden a considerar a *Giardia* como un organismo de características muy primitivas, aislado, al igual que el resto de Diplomonádidos, del resto de los flagelados (Kolisko y col., 2005; Sugaya y Otsuka, 2002). Por lo que la búsqueda, junto con el estudio biológico y molecular de proteínas con funciones semejantes a las existentes en organismos más evolucionados, puede contribuir al conocimiento de la evolución de las mismas.

Los trofozoítos poseen un tipo de alimentación por pinocitosis, habiéndose descrito vacuolas digestivas en la superficie dorsal (Meyer, 1990). Hay que mencionar que la inmunolocalización de estas proteínas en el trofozoíto de *Giardia* hace que aparezcan en la parte dorsal, en el disco suctorio y rodeando las vacuolas (Hasan y col., 2005). En su ambiente natural, es decir en casi ausencia de oxígeno, los trofozoítos de *Giardia lamblia* metabolizan la glucosa hasta etanol y alanina, mientras que concentraciones subtóxicas de oxígeno permiten la producción de CO₂ y acetato (Paget y col., 1990, 1993). El metabolismo energético de estos flagelados, está ligado al metabolismo de algunos aminoácidos, entre los que se encuentra la arginina como principal fuente de energía, y la alanina como producto final del metabolismo (Edwards y col., 1989). Los trofozoítos poseen un mecanismo de transporte para captar la alanina, a pesar de que pueden producirla a partir de piruvato, mediante la enzima alanin-aminotransferasa (Pager y col., 1993), sin embargo, bajo ciertas condiciones la alanina puede convertirse en la mayor fuente de energía para este protozoo. Los trofozoítos de *Giardia lamblia* necesitan incorporar lípidos y ácidos grasos ya formados, puesto que la glucosa, la treonina, el acetato e incluso el acetil-CoA formado en el metabolismo de la glucosa, no son usados en la biosíntesis de estos (Jarroll y col., 1981), por lo que los trofozoítos de *Giardia* dependen casi

exclusivamente de los lípidos preformados, siendo incapaces de sintetizarlos “de novo” (Jarroll y col., 1989).

Los lípidos deben ser incorporados desde el intestino del hospedador mediante la absorción de lipoproteínas, de micelas formadas por las sales biliares (Lujan y col., 1996), o mediante otros mecanismos semejantes al de los organismos más evolucionados. *Giardia* incorpora ácidos grasos como araquidónico y palmítico, tanto en forma de fosfolípidos, como en forma de lípidos neutros (Blair y Weller, 1987; Hiltbold y col., 2000). En un análisis de los ácidos grasos existentes en los trofozoítos de *Giardia*, se encuentra palmítico y esteárico como ácidos grasos saturados, y oleico y linoleico como insaturados (Das S. y col., 2002). *Giardia* incorpora un 90% de ácido palmítico, mientras que solo incorpora un 10% de ácido araquidónico (Gibson y col., 1999). Incorpora también ácidos grasos en forma de fosfolípidos, tanto mediante la vía de acilación como mediante la vía reacylación (Stevens y col., 1997; Gibson y col., 1999; Das y col., 2001, 2002).

El sistema de transporte de los ácidos grasos al interior de la célula, fue considerado durante mucho tiempo como consecuencia de la difusión pasiva de los ácidos grasos a través de la membrana, sin embargo actualmente se considera que la entrada de estos ácidos grasos dentro de los diferentes compartimientos celulares sigue una cinética, lo que es incompatible con una simple difusión (Abumrad y col., 1981. Abumrad y col., 1984. Stremmel, 1988). Dado que la solubilidad de los ácidos grasos es muy débil en el agua, se pensó que su metabolismo era casi imposible sin la participación de proteínas que aumentasen su solubilidad en los medios acuosos y facilitasen su movimiento a través el citoplasma (Stewart y col., 1991; Luxon y col., 1993; Luxon, 1996; Veerkamp, 1995, Kaikaus y col., 1990). Se han identificado una serie de proteínas, aisladas de membrana y del citosol, capaces de interaccionar con los ácidos grasos, (Fujii y col., 1987; Cooper y col., 1989; Stremmel y col., 1992). Dichas proteínas citoplasmáticas, caracterizadas por su capacidad para ligar la cadena larga de los ácidos grasos, se han denominado como fatty acid binding protein (FABP) (Ockner, y col. 1972). Las FABPs que han sido identificadas hasta ahora, son proteínas que conservan una estructura secundaria similar entre todas las especies en las que se las ha buscado. Exhiben una alta afinidad mediante enlaces no covalentes hacia las pequeñas moléculas hidrófobas; incluyendo al factor de proliferación de los peroxisomas (PPF) (Bass, 1985. Dutta-Roy y col., 1987. Khan y col., 1990; Cannon y col., 1991). Todas ellas pertenecen a una familia de proteínas, con capacidad de asociarse de forma reversible con los ácidos grasos, que se derivan de diez o más genes estructurales, y contienen 127-136 residuos de aminoácidos (Ockner, 1990). La secuencia de aminoácidos, muestra gran similitud con los de una molécula descubierta en 1987 por Mogensen y col., (1987), una proteína que posee afinidad para la cadena

mediana y larga de los acyl-Coa esterificados. Dentro de la misma familia se incluyen varias proteínas, las capaces de ligar el ácido retinoico, la gastropina y las denominadas “Mammary-Derived Growth Inhibitor (MGDI)”. Dichas proteínas fueron principalmente identificadas en órganos de animales superiores, como hígado, intestino y corazón, y más tarde en invertebrados, incluyendo a los helmintos parásitos (Hillyer, 1995; Esteves y Ehrlich, 2006). Además de en el mundo animal, las FABPs se pueden encontrar también en plantas (Tchang y col., 1985; Arondel y col., 1990a; García-Olmedo y col., 1995). En general, las FABP o BLP de origen animal poseen unos 14 kDa y pI ácido, mientras que las purificadas en plantas poseen unos 8 kDa (Arondel et al., 1990b), siendo en la avena (*Avena sp.*) de 8.7 kDa (Rikers y col., 1984), y en el trigo (*Triticum sp.*) de 7 kDa (Castagnaro y García-Olmedo, 1994), entre otras. Recientemente nuestro grupo ha caracterizado proteínas con función parecida en protozoos parásitos, mostrando un pI también ácido, y una M_w de alrededor de 8 kDa (Hasan y col., 2002a; Maache y col., 2005).

Las FABP muestran una semejanza escasa o moderada con respecto a su estructura primaria, es decir su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, los estudios cristalográficos con difracción de rayos X muestran que estas proteínas tienen mucha semejanza con respecto a su estructura terciaria, formada por diez cadenas β antiparalelas y dos cadenas en α . Las cadenas β poseen una longitud de 4 a 10 aminoácidos. Las dos α -hélices, son cortas, y se localizan entre la primera y la segunda cadena β . Las cadenas β están reunidas formando dos planos de cinco cadenas cada uno, organizados en forma de barril, llamado “ β -clam”. Los aminoácidos más conservados en esta estructura son los que se sitúan entre las cadenas β , es decir, glicinas, asparraguinas, y aspartatos, que son necesarios para la formación de las vueltas de las cadenas β (Banaszak y col., 1994; Hodsdon y Cistola, 1997) (Fig. 6).

La arquitectura de β barril da origen a una cavidad central que acoge al ligando. Los ácidos grasos entran en esta cavidad por su grupo carboxilo, y esta cavidad llega a taparse con las dos α -hélices, ligándose en su interior el ácido graso mediante una interacción iónica entre su grupo carboxilo y una arginina o tirosina. En el sitio de unión, se produce además una red de puentes hidrogeno e interacciones hidrofóbicas para estabilizar la orientación de la cadena del ácido graso (Xu y col., 1993; Jakoby y col., 1993). La estructura de β -clam confiere una gran estabilidad a la estructura terciaria, es decir, las modificaciones químicas y la mutagénesis de alguno de sus aminoácidos no cambian el plegamiento de la proteína.

La mayoría de las FABPs no muestran cambios significativos en su conformación mientras ligan al ácido graso, si bien la forma “holo” (forma ligada) de las proteínas posee más estabilidad que la forma “apo” (forma no

ligada). En la forma “apo”, la cavidad central contiene 24 moléculas de agua ordenadas, las cuales se expulsan al ligarse al ácido graso, así el volumen de la forma ligada no cambia, mostrando a su vez una gran estabilidad (Storch y col., 1989; Hodson y Cistola, 1997).

La mayor homología entre estas proteínas, reside en el primer exón de un conjunto de genes formados por cuatro exones y tres intrones, donde el extremo N-terminal aparece acetilado. Chan en 1985 estimó que las FABPs “modernas”, es decir aquellas que se encuentran presentes en mamíferos y aves, se originaron partiendo de una proteína ancestral hace unos 1000 millones de años (Chan y col., 1985). Dicha proteína, compuesta por al menos nueve estructuras emparentadas, exhibe una alta afinidad por la cadena larga de los ácidos grasos.

El origen polifilético de las FABP de vertebrados, viene demostrado en función de su estructura primaria. Así las FABPs de *Bufo arenarum*, pertenecen al subtipo de las FABP hepáticas de pollo, siendo estructuralmente y funcionalmente distintas a las FABP del hígado de los mamíferos (Di Pietro y col., 2003). En el hígado del tiburón *chimaera fish* hay una sola FABP que pertenece al tipo cardíaco de mamíferos (Córdoba y col., 1998). Los análisis evolutivos de las secuencias de aminoácidos sugieren una duplicación lejana de un gen ancestral, común de esas dos proteínas hepáticas. Las FABPs del hígado del pollo, sapo y peces provienen de un gen distinto que el de las FABPs del hígado de los mamíferos (Di Pietro y col., 1997). En el hígado del ajolote (*Ambystoma mexicanum*), se ha encontrado los dos subtipos de FABPs hepáticas (Di Pietro y col., 1999).

Se han aislado varias proteínas capaces de ligar ácidos grasos en invertebrados, incluyendo a los helmintos parásitos. Entre otras encontramos la Sm14-FABP de *Schistosoma mansoni*, Sj-FABP en *Schistosoma japonicum*, Fh15-FABP de *Fasciola hepatica* y Fg-FABP de *Fasciola gigantica* (Moser y col., 1991; Hillyer 1995; Smooker y col., 1997; Espino y col., 2001). La mayoría de estas proteínas muestran semejanzas con las identificadas en algunos tejidos de mamíferos; como la H-FABP y la L-FABP (Alvite y col., 2001; Esteves y col., 1993; Binas y col., 1999) Una revisión de estas proteínas en helmintos ha sido publicada por A. Esteves y R. Ehrlich en 2006, destacando que todas ellas provienen de un antepasado común cerca de la fractura entre vertebrados e invertebrados.

Las FABPs aisladas de los parásitos comparten en general la estructura secundaria de las FABPs de mamíferos, reforzando la idea de que la capacidad de unión a varios ligandos puede ser debida a las diferencias en su estructura molecular. Si bien la estructura secundaria es parecida a la de los organismos superiores, las secuencias de sus aminoácidos poseen

homologías bajas o muy bajas. Así de esta forma las FABP de *Echinococcus* (Eg-FABP), muestran una homología en su secuencia del 41% de identidad con las H-FABP, del 31% con I-FABP y del 20% con las L-FABP (Alvite y col. 2001). El análisis de la estructura, la secuencia y la forma de ligar los ácidos grasos de la proteína As-p18 de *Ascaris suum*, aislada del fluido perivisceral de la larva L₂, muestra homologías con las proteínas capaces de ligar los lípidos intracelulares (iLBP del 28%), con las FABPs de Cestodes (Eg-FABP 28%), Trematodes (*S. mansoni* 28%), y de vertebrados (H-FABP 27%), (LaLonde y col., 1994; Narayanan y col., 1988; Billich y col., 1988).

El número de bandas obtenidas en nuestros experimentos durante las separaciones electroforéticas en SDS-PAGE (12,5% y 20%), en condiciones no reductoras, de la fracción proteica purificada de *Giardia*, induce a primera vista a pensar que la purificación no se ha conseguido, dado el patrón de bandas obtenido, con pesos moleculares comprendidos entre 8 y 120 kDa (8, 25, 29, 41, 49, 55, 60, 65, 69, 78, 90, 120 kDa). Sin embargo, al separar mediante isoelectroenfoque (IEF) de la fracción purificada, produjo una única banda con un pI de 4.96, semejante a la obtenida con la FABP de Girasol.

Pensamos por tanto que las bandas aparecidas durante la separación electroforética en SDS-PAGE no podrían deberse a la falta de pureza de la muestra, ni a la presencia de isoformas de la misma proteína, sino a un fenómeno de agregación. Una propiedad que caracteriza a las proteínas tipo FABP, ya descrita por Fournier y col., (1983, y 1990), para las FABP aisladas de músculo cardíaco (H-FABP). En condiciones normales, la H-FABP da lugar a la aparición de 4 bandas distintas durante una separación SDS-PAGE. A dichas bandas, los autores anteriormente citados, las denominaron como especies.

El fenómeno de autoagregación de las proteínas purificadas de *Giardia*, se comprobó al tratar la banda de 8 kDa con diferentes enzimas proteolíticas inmovilizadas, como son la papaína y la tripsina, dos enzimas que cortan por los aminoácidos fenilalanina y lisina respectivamente. Dicho tratamiento se llevó a cabo al objeto de intentar conseguir un mapeo de la banda de 8 kDa, pero los resultados obtenidos demostraron que al separar electroforéticamente el resultado del tratamiento enzimático, aparecía una banda de 30 kDa, lo que viene a indicar que la agregación en la proteína tratada se debe originar a través de las partes más hidrofóbicas de las moléculas fragmentadas. Los estudios llevados a cabo con esta proteína por Hassan y col. (2005), revelan que la inmunoprecipitación con anticuerpos generados frente a la banda de 8 kDa o la electroelución de dicha banda, y su posterior precipitación con los mismos anticuerpos, genera una serie de

bandas similares a la mostrada por la fracción purificada. Lo que apoya la idea de la agregación.

Las constantes de asociación y disociación K_a y K_d , permiten sugerir que el proceso de auto-agregación puede ser quizás una herramienta intracelular para regular la actividad y la unión a las membranas de estas proteínas (Fournier y Rahim, 1983)

Cuando se intentó comprobar la afinidad hacia el ácido oleico marcado de las diferentes fracciones aparecidas en la electroforesis, únicamente la banda de menor peso molecular era la que mostraba afinidad por el ácido graso.

Las diferencias en la capacidad de unir sustancias hidrofóbicas entre las especies libres y las oligoméricas de las FABP, pueden constituir “*in vivo*” un mecanismo de regulación del transporte de sustancias hidrofóbicas, como se ha sugerido para la H-FABP por Fournier y Richard (1988, 1990), y por Janssen y Barrett (1995) para el caso de la LPB de *Moniezia expansa*. La incapacidad de captar los ácidos grasos por parte de los agregados de la proteína, sugiere que en el proceso de agregación deben existir cambios en la estructura secundaria que impiden el normal acceso del ácido graso al interior de la estructura β clam. Está descrito que la presencia del ligando en el medio, induce una serie de cambios conformacionales en la FABP purificada. Estos cambios conformacionales inducidos por el ligando, pueden ser una característica de esta familia de proteínas, como ocurre con la H-FABP, y la proteína capaz de ligar el retinol (CRBP) (Jamison y col., 1994). La importancia funcional de estos cambios, es interesante en el caso de los receptores nucleares de hormonas pertenecientes a este tipo de proteínas; el receptor de estrógeno y la PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma*). Es posible que estos cambios inducidos por el ligando en la estructura de las FABPs faciliten la interacción de la proteína con los orgánulos citoplasmáticos en los que se utilizarían los ácidos grasos (Berger y col., 1996; Allan y col. 1992; McDonnel y col., 1995), lo que afectaría a su afinidad y a la capacidad para ligar el ácido graso de manera especial, cuando estas proteínas posean varios sitios de unión (Fournier y Rahim, 1983). Casi todas las FABPs identificadas, ligan una molécula de ácido graso a través de su centro de unión (Glatz y Veerkamp, 1985; Galtz y col., 1985), salvo la L-FABP y la H-FABP de rata, que son capaces de ligar dos moléculas de ácidos grasos por sitio de unión (Offner y col., (1986).

El análisis mediante espectrometría de masas Malditoff mostró que la banda con afinidad por los ácidos grasos poseía una masa de 8215 Da, masa semejante a la obtenida previamente por Hassan y col., (2002a y 2002b) para una proteína de *Giardia* con afinidad para ácidos grasos y por

Maache y col., (2005) para una proteína de *Leishmania* con características semejantes.

Los experimentos de desplazamiento que se llevaron a cabo con la FABP purificada de *Giardia*, fueron realizados siguiendo los ensayos descritos por Frolov y col. (1997) con las FABPs de hígado (L-FABP), corazón (H-FABP) e intestino (I-FABP). Estos autores calcularon la afinidad de la proteína I-FABP hacia el ligando, usando una curva de desplazamiento del ácido oleico, mostrando una clara afinidad de la I-FABP por los ácidos de cadena larga saturada, y no saturada, de más de C 24:1, mientras que la M-FABP prefiere los ácidos grasos de cadena no saturada de 18 átomos de carbono como el oleico, palmítico, o ácido linoleico (Frolov, y Schroedrer 1997).

La constante de desplazamiento mostrada por la proteína de *Giardia* cuando esta es ligada a ácido oleico, y es desplazada a su vez por una mayor concentración de ácido oleico, fue de una K_d de 0.0312 μM . Este valor es similar a las constantes de desplazamiento para con el oleico, mostradas por otras FABP o LBP, como se muestra en la siguiente tabla:

PROTEÍNA	CONSTANTE DE DESPLAZAMIENTO
(1) EgFABP1	K_d 0.024 \pm 4 μM
(2) A-FABP	K_d 0.0005 μM
(2) E-FABP	K_d 0.003 μM
(3) BLBP	K_d 0.44 μM
(4) L-FABP	K_d 0.26 μM
(5) I-FABP	K_d 0.0051 \pm 2.8 μM
(5) ABA-1	K_d 0.013 x μM
(6) H-FABP	K_d 0.44 \pm 0.05 μM
(7) LBP	K_d 0.760 μM
Leis FABP	K_d 0.39 μM

- (1) Alvite y col., 2001.
- (2) Kruchten y col., 2003.
- (3) Xu y col., 1996.
- (4) Rolf y col., 1995.
- (5) Kurian y col., 1996.
- (6) Kennedy y col., 2000.
- (7) Janssen y Barret, 1995.

El oleico es a su vez desplazado por otras sustancias como sales biliares, ácido palmítico, ácido araquidónico, α -tocofenol, metronidazol, y en menor medida por ácido retinoico y testosterona, pudiéndose observar como el

desplazamiento del ácido oleico radiactivo ocurre en los primeros 15 minutos de la incubación. Es de destacar la alta afinidad de desplazamiento mostrada por el metronidazol, sustancia insoluble y fármaco de elección habitual frente a la giardiosis (Gazder y Banerjee, 1978). Si bien se sabe que el mecanismo de acción de este fármaco es la oxidación de las membranas y de los ácidos nucleicos (Goodman y Gilman, 1985), la incorporación del mismo al citoplasma celular podría realizarse a través de proteínas transportadoras de ácidos grasos.

Otras moléculas como el ácido palmítico, ácido araquidónico, y ácido butírico, indujeron desplazamientos menores que los logrados por el metronidazol o algunas de las sales biliares. El menor desplazamiento observado con estos últimos ácidos grasos, sugiere que las proteínas purificadas por nosotros muestran mayor afinidad hacia los ácidos grasos saturados que hacia los no saturados, al igual que ocurre con algunas FABP de mamíferos como la M-FABP (Frolov y Schroeder, 1997).

Como se ha indicado al principio de la Discusión, en los trofozoítos de *Giardia* se encuentra ácido palmítico y ácido esteárico como ácidos grasos saturados, y ácido oleico y ácido linoleico como insaturados (Das S. y col., 2002). Todas las FABP descritas hasta este momento no solo muestran afinidad para los ácidos grasos, sino que también ligan sustancias tales como colesterol, sales biliares, hormonas, vitaminas junto con otras sustancias hidrofóbicas, por lo que estas proteínas deben jugar un papel importante en la biología y ciclo de vida de este protozoo. Lujan y col 1996, demostraron el papel de los lípidos en la regulación del ciclo del protozoo, al ser capaces junto al colesterol de regular el proceso de enquistamiento de *Giardia* en el intestino del hospedador.

El estudio del rendimiento del proceso de purificación fue del 53.13 %, evaluado mediante fluorimetría, al unirse las proteínas purificadas al ácido 11-(dansyl amino) undecanoico, o también llamado DAUDA, que se utiliza como análogo fluorescente de los ácidos grasos. Este rendimiento está en consonancia con los rendimientos obtenidos por Janssen y Barrett (1995) para la purificación de la LBP de *Moniezia expansa*.

3`RACE de la FABP de *Giardia lamblia*.

Al idear una posible estrategia para el aislamiento de cualquier gen, esta la basamos en la búsqueda de secuencias conservadas a partir de las cuales poder diseñar una pareja de oligonucleótidos que permita la amplificación de un fragmento del gen problema de la especie donde su secuencia no se conoce. Por esta razón, nos propusimos descubrir zonas conservadas de las FABPs comparando entre sí secuencias procedentes de diferentes especies. Algunas de ellas más próximas evolutivamente a *Giardia* que otras.

Los alineamientos entre estas secuencias han venido a demostrar que aunque la función que desempeñan las FABPs está altamente conservada a lo largo del reino animal, las secuencias de nucleótidos que las codifican muestran un alto grado de variación, y por tanto, una escasa homología. Aún así, debido a la degradación del código genético, las secuencias de nucleótidos pueden presentar una mayor divergencia que las secuencias de aminoácidos de las proteínas que codifican. No obstante, las secuencias de aminoácidos tampoco mostraron una homología especialmente elevada. La causa de estos hechos puede deberse a que la función de estas proteínas depende más de su estructura secundaria, que de su secuencia de aminoácidos, tal como sugiere Alvite y col. (2001), que muestra como las secuencias de las FABP mantienen escasamente un 28% de homología.

Puesto que las escasas regiones de homología no permiten el diseño de una pareja de oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento de FABP de *Giardia*, decidimos diseñar un único oligonucleótido para la realización de un 3`RACE, tal como se describe en el apartado de Material y Métodos. Una pareja de oligonucleótidos que amplificaban un fragmento de la Glucosa 6-Fosfato Isomerasa se utilizaron como control de las reacciones. Los resultados demostraron una suficiente calidad del RNA, ya que se logró amplificar un fragmento de la G6PI a partir del cDNA retrotranscrito, y esta amplificación falló en ausencia de retrotranscripción, demostrando así la ausencia de contaminación de DNA genómico en las muestras. Sin embargo, no hubo en ningún caso amplificación del fragmento de FABP. Esta ausencia de efectividad de la reacción se debe, seguramente, a que la divergencia de las secuencias de nucleótidos es lo suficientemente alta como para que el oligonucleótido elegido dentro del pequeño fragmento conservado no mantenga una suficiente homología con la secuencia desconocida del gen correspondiente en *Giardia*. No es por tanto posible utilizar secuencias de otras especies sobre las que basar una estrategia de clonación de una FABP de *Giardia*.

Genoteca de expresión y aislamiento de clones.

El siguiente paso por tanto, consistió en intentar aislar una FABP de *Giardia* a partir de una genoteca de expresión. Para ello se extrajo los mRNA de trofozoitos de *Giardia*, construyendo una genoteca de cDNA de la que poder obtener algún clon que codificase algún péptido con reacción cruzada frente a anticuerpos anti-FABP.

El rastreo de la genoteca de expresión tras la inducción por IPTG nos permitió encontrar algunos clones con reacción positiva frente a los anticuerpos.

Tras la secuenciación rutinaria de los clones que mostraron señal positiva, uno de ellos fue seleccionado para su posterior estudio inmunológico, denominándose GCR3-4.

Los alineamientos mediante BLAST del clon GCR3-4 revelaron una identidad del 100% en 70 aminoácidos consecutivos respecto a una supuesta proteína de *Giardia lamblia* de función aún desconocida, la GLP_554_36323_36111, con un peso molecular de 8236 Da. El gen correspondiente fue aislado por Morrison y col., y enviado a las bases de datos de DNA (EMBL/GenBank/DDBJ) por estos autores en marzo del 2003.

Otra porción de la proteína codificada por GCR3-4, presentó una homología del 53% con otra proteína también de función desconocida: la GLP_554_41472_36361 con una identidad de 41 aminoácidos sobre un total de 76.

La región central de GCR3-4, que contiene varios codones de stop, no mostró ninguna homología con proteína conocida.

La existencia de esta secuencia intermedia supuestamente no codificante, nos hizo investigar la posibilidad de que GCR3-4 procediese de un mRNA sin madurar o parcialmente maduro o que un intrón con maduración alternativa pudiese haberse retenido en el mRNA, o incluso que una mutación en algún sitio esencial para su eliminación pudiese provocar su permanencia en el mismo.

La presencia de intrones en *Giardia*, no fue descrita hasta que Nixon y col (2002) encontraran el primer intrón espliceosómico en esta especie, de tan solo 35 nucleótidos de longitud, en el gen de la ferredoxina, además de en algunos genes potencialmente implicados en la formación del spliceosoma (Nixon y col., 2002). Los autores postulaban la posibilidad de que existiesen otros intrones aún por descubrir y un conjunto completo de genes implicados en la formación del espliceosoma. Russel y col., (2005) encontraron efectivamente un intrón espliceosómico en el gen que codifica la proteína ribosómica Rpl7a. Estos descubrimientos llevan el origen de los intrones a un punto del árbol filogenético de los eucariotas anterior al supuesto para el descubrimiento de estos intrones. La posibilidad de que GCR3-4 presente un intrón supone por tanto un importante apoyo a un origen antiguo de los intrones, tal como sugiere Johnson (2002).

Los resultados sobre predicción de intrones muestran varios posibles lugares correspondientes a los límites entre exones e intrones. Los extremos del fragmento que no codifican ningún péptido conocido deberían indicarnos las posiciones de comienzo y final del intrón, no obstante, estas posiciones no tienen por qué ser las correctas, debido a varios factores. En primer lugar, puesto que la secuencia ha sido traducida *in silico* en toda su longitud, pasando a través de los codones de STOP, los estudios de homología pueden incluir en los extremos algunos aminoácidos que no se traduzcan *in vivo* por corresponder realmente a secuencias del extremo del intrón. En segundo lugar, también es posible el efecto contrario. Aminoácidos del extremo del exón pueden quedar excluidos del alineamiento si no presentan una buena homología con el gen correspondiente de otra especie, o con el dominio correspondiente en otro gen de la misma familia. Por tanto, los extremos del fragmento peptídico excluido por los alineamientos solo son indicativos de las posiciones reales de los extremos de un supuesto intrón.

De acuerdo con los resultados expuestos en el apartado correspondiente, el péptido del supuesto primer exón comienza desde el primer nucleótido de la segunda pauta de lectura, es decir desde el nucleótido en posición 2, hasta el aminoácido 59, que correspondería al nucleótido 178, presentando una menor homología hasta llegar al aminoácido 76, nucleótido 229. Precisamente, en la posición 193 se encuentra el único sitio que podría actuar como “donador” en un “splicing”, e indicaría un comienzo de un intrón. Esta posición corresponde precisamente a la segunda pauta de lectura, que en los resultados de predicción de intrones aparece como la pauta 1, ya que el programa de predicción las numera como 0, 1 y 2 respectivamente. Utilizando las reglas para *C. elegans*, no se detectó ningún posible lugar “donador”.

El principio del segundo péptido identificado, comienza en el aminoácido 148, nucleótido 445. Posibles candidatos como lugares “aceptores” en esta región son las posiciones 348 y 468. Esta segunda posición (468) implicaría que los primeros aminoácidos del alineamiento no corresponderían a residuos traducidos *in vivo*, aunque ésta es la única secuencia “aceptora” que coincide con las reglas de *C. elegans*. La posición 348 implicaría la presencia en el péptido de otros aminoácidos no incluidos en el alineamiento, lo que tendría explicación bajo la suposición de que el péptido incluyese un dominio conservado que comenzase en la posición del aminoácido 148, no estando conservados los aminoácidos anteriores próximos a ella, lo que los habría excluido del alineamiento.

No obstante, hemos de tener en cuenta que ambas posiciones implicarían un cambio en la pauta de lectura, lo que no iría en consonancia con el hecho de que los dos péptidos con mayor homología correspondan a la misma pauta, y ninguno de los péptidos potencialmente codificados por las otras pautas de lectura del supuesto exón 2 presentan una homología significativa con otra secuencia conocida.

El intrón descrito por Nixon y col (2002) presenta, no obstante, ciertas variaciones en la secuencia canónica de los extremos del intrón, por lo que aun cabe la posibilidad de que nos encontremos ante un caso similar, y se esté utilizando como “donador” o “aceptor” una posición diferente de las predichas por NetGene2, sobre todo si tenemos en cuenta que las reglas de identificación de intrones utilizadas por este programa están diseñadas para humanos, *C. elegans* o *A. thaliana*.

Es indudable, que la comprobación de que esta secuencia pueda ser eliminada del mensajero *in vitro* o *in vivo* arrojará luz acerca de ésta posibilidad y abre buenas expectativas para la realización de futuros estudios que puedan tener una importante repercusión sobre nuestros conocimientos acerca del origen de los eucariotas.

Respecto a la identificación o posible función de las proteínas codificadas por este clon aislado en este trabajo, hemos de considerar por un lado que presentan reacción cruzada frente a los sueros con los anticuerpos anti-FABP y que sin embargo, no presentan homología con otras FABPs, LBPs o ACBPs. No obstante, debemos recordar que la homología entre las FABP o BLP de diferentes especies no sobrepasa el 27-28%. Por ejemplo, la FABP de ratón presenta una homología del 27% con la P55053 de rata FABPE_RAT (22 aminoácidos de un total de 81), o del 25% con la FABP de células epidérmicas de ratón P55053, obteniéndose porcentajes similares cuando se comparan con las de otras especies.

Lo que sí conservan las distintas FABP es una estructura secundaria similar, con cadenas α β . Nuestros resultados demuestran que las proteínas codificadas por el clon GCR3-4, no son proteínas globulares, pero tienen fragmentos en α y en β , presentando una porción de aminoácidos expuestos en su superficie similar a las FABP. Lo que parece indicar que en su estructura existen partes hidrofóbicas inaccesibles a los solventes polares. Análisis posteriores sobre estas proteínas recombinantes aportarán más datos acerca de su capacidad de unión a ácidos grasos, así como de su inmunogenicidad. La escasa homología entre las distintas FABP hace por tanto imprescindible abordar en el futuro estudios funcionales que puedan caracterizar éstas proteínas, encontrando así una función para las mismas, y

para las GLP_554_36323_36111 y GLP_554_41472_36361 con las que comparten un dominio del 100% y del 53% de homología respectivamente.

5 CONCLUSIONES.

1° Se ha purificado y caracterizado una proteína de *Giardia lamblia* con afinidad para con los ácidos grasos, sales biliares, ácido Palmítico, ácido Araquidónico, ácido Retinoico, α -Tocofenol, y Testosterona, poseyendo características semejantes a las proteínas aisladas de vertebrados e invertebrados denominadas como FABP o proteínas ligadoras de ácidos grasos. Dicha proteína posee un peso molecular de 8.2 kDa y punto isoelectrico de 4.96, con una constante de desplazamiento para el ácido oleico que se encuentra en el mismo rango que la mostrada por este tipo de proteínas aisladas de invertebrados parásitos.

2° Se ha comprobado que dicha proteína es reconocida por las IgAs secretoras existentes en la saliva de pacientes con una giardiosis activa. Los intentos de conocer los epítomos inmunodominantes, tras el tratamiento con diferentes proteasas, no han proporcionado respuesta positiva debido a la formación de agregados proteicos, posiblemente formados a través de la unión de las partes hidrofóbicas de los fragmentos resultantes de dichas proteínas.

3° Con la obtención de una secuencia consenso en base a las secuencias conocidas de proteínas capaces de ligar ácidos grasos de invertebrados y vertebrados, no se pudo obtener respuesta positiva de amplificación en DNA de *Giardia*, quizás como consecuencia de la enorme variabilidad que dichas proteínas poseen dentro del propio organismo y entre las diferentes especies comparadas. Esto unido a la enorme distancia filogenético a la que se encuentra *Giardia*, hace pensar que la estructura primaria de la proteína no es realmente importante para su función, siendo esta especialmente determinada por la estructura terciaria.

Por otra parte, los cebadores correspondientes a la Glucosa 6-Fosfato Isomerasa de *Giardia* utilizados como control si dieron respuesta positiva de amplificación.

4° Se ha logrado aislar un clon de la genoteca de expresión llevada a cabo al efecto en *Giardia*, que es reconocido por los anticuerpos frente a las proteínas nativas ligadoras de ácidos grasos. Dicho clon denominado GCR3-4, contiene un inserto en su interior con una identidad del 100% en 70 aminoácidos consecutivos con una proteína “putativa” de *Giardia lamblia* de función aún desconocida, y denominada GLP_554_36323_36111, teniendo el fragmento reconocido de esta proteína un peso molecular de 8236 Da.

De igual manera dicho clon posee una identidad del 53% con otra proteína de *Giardia* también de función desconocida llamada

LP_554_41472_36361, con una homología en 41 aminoácidos sobre un total de 76.

5° Las proteínas recombinantes codificadas por el clon GCR3-4, tienen fragmentos en α y en β , presentando una porción de aminoácidos expuestos en su superficie similar a las FABP, por lo que en su estructura existen partes hidrofóbicas inaccesibles a los solventes polares.

6° Se ha caracterizado la posible existencia de un intrón en el interior de la secuencia del inserto perteneciente al clon GCR3-4.

De acuerdo con las reglas para humanos, el intrón comenzaría en el interior de una parte de la secuencia que empieza en el nucleótido 179 y termina en el nucleótido 229, con un sitio en la posición 193 que podría actuar como “donador” en un “splicing”, indicando el comienzo del intrón. Mientras que el final del intrón se localizaría en dos posibles lugares “aceptores” que se encuentran en las posiciones 348 y 468.

La comprobación de la existencia de dicho intrón, repercutirá sobre los conocimientos acerca del origen filogenético de los eucariotas y la reproducción sexual.

6 BIBLIOGRAFIA.

Abumrad N.A., Coburn C., Ibrahim A. (1999). Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 4-13.

Abumrad N.A., El-Magrabi M.R., Amri E.Z., Lopez E., Grimakli P.A. (1993). Cloning of Rat Adipocyte Membrane Protein Implicated in Binding or Transport of Long-chain Fatty Acid That is Induced During Preadipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* 268, 17665-17668.

Abumrad N.A., Forest C.C., Regen D.M., Sandres S. (1991). Increase in membrane uptake of long-chain acids early during preadipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6008-6012.

Abumrad N.A., Park J.H., Park C.R. (1984). Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. *J Biol Chem.* 259(14):8945-53.

Abumrad N.A., Perkins R.C., Park J.H., Park C.R. (1981). Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem.* 256(17):9183-91.

Adam R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):447-475.

Adam R.D. (2000). The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol.* 30(4):475-84.

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

Adam R.D., Aggarwal A., Lai A.A., de la Cruz V.T., McCutchan T., Nash T.E. (1988). Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J. Exp. Med.* 167: 109-118.

Addiss D.G., Davis J.P., Roberts J.M., Mast E.E. (1992). Epidemiology of giardiasis in Wisconsin: increasing incidence of reported cases and unexplained seasonal trends. *Am J Trop Med Hyg.* 47(1):13-19.

Addiss D.G., Mathews H.M., Stewart J.M., Wahlquist S.P., Williams R.M., Finton R.J., Spencer H.C., Juranek D.D. (1991). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. J Clin Microbiol. 29(6):1137-1142.

Aggarwal A., Merritt J.W., Nash T.E. (1989). Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 32: 39-48.

Aggarwal A., Nash T.E. (1988). Antigenic variation of *Giardia lamblia* in-vivo. Infet. Immun. 56: 1420-1423.

Al-Sherbiny M., Osman A., Barakat R., El Morshedy H., Bergquist R., Olds R. (2003). In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. Acta Trop. 88(2):117-30.

Alpers D.H., Bass N.M., Engle M.J., DeSchryver-Kecsckemeti K. (1999). Intestinal fatty acid binding protein may favour differential apical fatty acid binding in the intestine. Biochim. Biophys. Acta 1483: 352-362.

Alvite G., Di Pietro S.M., Santome J.A., Ehrlich R., Esteves A. (2001). Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. Biochim Biophys Acta. 1533(3):293-302.

Allan G.F., Leng X., Tsai S.Y., Weigel N.L., Edwards D.P., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1992). Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. J Biol Chem. 267(27):19513-20.

Andrews A.T. (1986). En Electrophoresis, Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, pp. 241-288.

Andrews J.S., Hewlett E.L. (1981). Protection against infection with *Giardia muris* by milk containing antibody to *Giardia*. J. Infect. Dis. 143: 242-246.

Anthony G. Russell, Timothy E. Shutt, Russell F. Watkins, Michael W. Gray. An ancient spliceosomal intron in the ribosomal protein L7a gene (*Rpl7a*) of *Giardia lamblia*. BMC Evol Biol. 5: 45.

Arondel V., Kader J.C. (1990a). Lipid transfer in plants. Experientia. 46(6):579-85.

Aronde V., Vergnolle C., Tchong F., Kader J.C. (1990b). Bifunctional lipid-transfer: fatty acid-binding proteins in plants. *Mol Cell Biochem.* 98(1-2):49-56.

Baier L.J., Sacchetti J.C., Knowler W.C., Eads J., Paolisso G., Tataranni P.A., Mochizuki H., Bennett P.H., Bogardus C., Prochazka M. (1995). An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95: 1281-1287.

Baker Laboratory (1999). Competent Cells for Electroporation.

Banaszak L., Winter N., Xu Z., Bemlohr D.A., Cowan S., Jones T.N. (1994). Lipid-binding Proteins: A Family of Fatty Acid and Retinoid Transport Proteins, *Adv. Protein. Chem.* 45: 89-151.

Bass N.M. (1994). Update on the Bass appliance system. *J Clin Orthod.* 28(7):421-8.

Bass N.M. (1993). Cellular Binding Proteins for Fatty Acids and Retinoids: Similar or Specialized Functions?. *Mol. Cell. Biochem.* 123, 191-202.

Bass NM. (1985). Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins. *Chem Phys Lipids.* 38(1-2):95-114.

Bazan-Tejeda M.L., Arguello-Garcia R., Bermudez-Cruz R.M., Robles-Flores M., Ortega-Pierres G. (2006). Protein kinase C isoforms from *Giardia duodenalis*: identification and functional characterization of a beta-like molecule during encystment. *Arch Microbiol.*

Bednarska M., Bajer A., Sinski E., Girouard A.S., Tamang L., Graczyk T.K. (2006). Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in samples from terrestrial mammalian wildlife. *Parasitol Res.* Pag. 0932-0113.

Berger J., Bailey P., Biswas C., Cullinan C.A., Doebber T.W., Hayes N.S., Saperstein R., Smith R.G., Leibowitz M.D. (1996). Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology.* 137(10):4189-95.

- Billich S., Wissel T., Kratzin H., Hahn U., Hagenhoff B., Lezius A.G., Spener F. (1988). Cloning of a full-length complementary DNA for fatty-acid-binding protein from bovine heart. *Eur J Biochem.* 175(3): 549-56.
- Binas B., Danneberg H., McWhir J., Mullins L., Clark A.J. (1999). Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J.* 13(8):805-12.
- Blair R.J., Weller P.F. (1987). Uptake and esterification of arachidonic acid by trophozoites of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 11-18.
- Boord J.B., Fazio S., Linton M.F. (2002). Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 13(2):141-7.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brunak S., Engelbrecht J., Knudsen S. (1991). Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence. *Journal of Molecular Biology.* 220, 49-65.
- Buelt M.K., Bemlohr D.A. (1990). Modification of the adipocyte lipid binding protein by sulphydryl reagents and analysis of the fatty acid binding domain. *Biochem.* 29: 7408-7413.
- Butscher W.G., Fauhert G.M. (1988). The therapeutic action of monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Giardia muris*. *Immunology* 64: 175-180.
- Campbell F.M. Gordon M.J., Dutta-Roy A.K. (1994). Plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP) of the sheep placenta. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1214, 187-192.
- Cannon J.R., Eacho P.I. (1991). Interaction of LY171883 and other peroxisome proliferators with fatty-acid-binding protein isolated from rat liver. *Biochem J.* 280 (Pt 2):387-91.
- Cantarero L.A., Butler J.E., Osborne J.W. (1980). The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal Biochem.* 105(2):375-82.

Carlson J.R., Heyworth M.J., Owen R.L. (1986). Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *Giardia muris* infection in BALB/c mice. I. T-cell subsets. Cell. Immunol. 97: 44-50.

Castagnaro A., Garcia-Olmedo F. (1994). A fatty-acid-binding protein from wheat kernels. FEBS Lett. 349(1):117-9.

Cavus U., Coskun F., Yavuz B., Ciftci O., Sahiner L., Aksoy H., Deniz A., Ozakin E., Aytemir K., Tokgozoglul L., Kabakci G. (2006). Heart-type, fatty-acid binding protein can be a diagnostic marker in acute coronary syndromes. J Natl Med Assoc. 98(7):1067-70.

Chabalgoity J.A., Harrison J.A., Esteves A., Demarco de Hormaeche R., Ehrlich R., Khan C.M., Hormaeche C.E. (1997). Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated Salmonella vaccine strains. Infect Immun. 65(6):2402-12.

Chan L., Wei C.F., Li W.H., Yang C.Y., Ratner P., Pownall H., Gotto A.M. Jr, Smith L.C. (1985). Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. Functional and evolutionary implications. J Biol Chem. 260(5):2629-32.

Char S., Cevallos A.M., Yamson, P., Sullivan P.B., Neale G., Farthing M.J.G. (1993). Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigen in children with persistent diarrheic and giardiasis. Gut 34: 38-40.

Char S., Shetty N., Narasimha M., Elliot E., Macaden R., Farthing M. J. G. (1991). Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57 kDa antigen. Parasite Immunol. 13:329-337.

Chen N., Upcroft J.A., Upcroft P. (1995). A *Giardia duodenalis* gene encoding a protein with multiple repeats of a toxin homologue. Parasitology 111: 423-431.

Chmurzynska A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. J Appl Genet; 47(1): 39-48.

Cooper R.B., Noy N., Zakim D. (1989). Mechanism for binding of fatty acids to hepatocyte plasma membranes. J Lipid Res. 30(11):1719-26.

- Cordoba O.L., Sanchez E.I., Veerkamp J.H., Santome J.A. (1998). Presence of intestinal, liver and heart/adipocyte fatty-acid-binding protein types in the liver of a *chimaera* fish. *Int J Biochem Cell Biol.* 30(12): 1403-13.
- Corsi A., Nucci C., Knafelz D., Bulgarini D., Di Iorio L., Polito A., De Risi F., Ardeni Morini F., Paone F.M. (1998). Ocular changes associated with *Giardia lamblia* infection in children. *Br J Ophthalmol.* 82(1):59-62.
- Dallessio P.M., Ropson I.J. (1998). pH dependence of the folding of intestinal fatty acid binding protein. *Arch. Of Biochem. and Biophys.* 359(2): 199-208.
- Das S., Stevens T., Castillo C., Villasenor A., Arredondo H., Reddy K. (2002). Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol.* 32(6):655-75.
- Den Hollander N., Riley D., Befus D. (1988). Immunology of giardiasis. *Parasitol. Today* 4: 124-131.
- Di Pietro S.M., Dell'Angelica E.C., Veerkamp J.H., Sterin-Speziale N., Santome J.A. (1997). Amino acid sequence, binding properties and evolutionary relationships of the basic liver fatty-acid-binding protein from the catfish *Rhamdia sapo*. *Eur J Biochem.* 249(2):510-7.
- Di Pietro S.M., Corsico B., Perduca M., Monaco H.L., Santome J.A. (2003). Structural and biochemical characterization of toad liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry.* 42(27):8192-203.
- Di Pietro S.M., Veerkamp J.H., Santome J.A. (1999). Isolation, amino acid sequence determination and binding properties of two fatty-acid-binding proteins from axolotl (*Ambistoma mexicanum*) liver. Evolutionary relationship. *Eur J Biochem.* 259(1-2):127-34.
- Dube N., Delvin E., Yotov W., Garofalo C., Bendayan M., Veerkamp J.H., Levy E. (2001). Modulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in Caco-2 cells by lipids, hormones and cytokines. *J Cell Biochem.* 81(4):613-20.
- Dunn M.J. (1993). En Gel electrophoresis: Protein. (Graham, J.M. y Billington, D., cd.). Bios Scientific Publishers Limited, UK. P: 13-17, 41-42, 139-152.

Dutta-Roy A.K., Gopalswamy N., Trulzsch D.V. (1987). Prostaglandin E1 binds to Z protein of rat liver. *Eur J Biochem.* 162(3):615-9.

Dutta-Roy A.K., Sinha A.K. (1987). Purification and properties of prostaglandin E1/prostacyclin receptor of human blood platelets. *J Biol Chem.* 262(26): 12685-91.

Edson C.M., Farthing M.J.G., Thorley-Lawson D.A., Kcusch G.T. (1986). An 88,000 MW *Giardia lamblia* surface protein which is immunogenic in humans. *Infect. Immun.* 54: 621-625.

Edwards M.R., Gilroy F.V., Jimenez B.M., O'Sullivan W.J. (1989). Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 19-26.

Ellis J.E., Wyder M.A., Jarroll E.L., Kaneshiro E.S. (1996). Changes in lipid composition during in vitro encystation and fatty acid desaturase activity of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 18;81(1):13-25.

Engelkirk P.G., Pickering L.K. (1990). Detection of *Giardia* by immunologic methods. En, *Giardiasis*. Elsevier, Amsterdam. P.187-198.

Espino A.M., Rodriguez Medina J.R., Hillyer G.V. (2001). Isolation and immunological characterization of fatty acid binding protein isoforms from *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* 87(5):1028-33.

Espino A.M., Hillyer G.V. (2003). Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol.* 89(3):545-52.

Esteves A., Dallagiovanna B., Ehrlich R. (1993). A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 58(2):215-22.

Esteves A., Ehrlich R. (2006). Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142(3-4):262-74.

Farthing M.J.G., (1994). Giardiasis as a disease. En, *Giardia: From Molecules to Disease* (R.C.A. Thompson, J.A., Reynoldson y A.J. Lymbery, eds.). Cab International, Wallingford. P. 15-37.

Farthing M.J.G., Mata L.J., Urrutia J.J., Kommal R.A. (1986a). Giardiasis: Impact on child growth. In: Waiker-Smith, J.A. and McNeish, A.S. (eds) Diarrhoea and Malnutrition in Childhood, Butterworths. London pp. 68-78.

Farthing M.J.G., Pereira M.E.A., Keusch G.T. (1986b). Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. Infect. Immun. 51: 661-667.

Farthing M.J.G., Varon S.R., Keusch G.G. (1983). Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 467-469.

Faubert G.M. (1996). The immune response to *Giardia*. Parasitol. Today 12: 140-145.

Feely D.E., Holberton D.V., Erlandsen S.L. (1990). The biology of *Giardia*. En. Giardiasis (E.A. Meyer, ed.). Elsevier, Amsterdam. P. 11-49.

Forrest M., Isaac-Renton J., Bowie W. (1990). Immunoblot patterns of *Giardia duodenalis* isolates from different hosts and geographical locations. Can. J. Microbiol. 36: 42-46.

Fournier N.C., Richard M.A. (1990). Role of fatty acid-binding protein in cardiac fatty acid oxidation. Mol Cell Biochem. 98(1-2):149-59.

Fournier N.C., Richard M.A. (1988). Fatty acid-binding protein, a potential regulator of energy production in the heart. Investigation of mechanisms by electron spin resonance. J Biol Chem. 263(28):14471-9.

Fournier N.C., Rahim M.H. (1983). Self-aggregation, a new property of cardiac fatty acid-binding protein. Predictable influence on energy production in the heart. J Biol Chem. 258(5):2929-33.

Franca-Botelho A.C., Honorio-Franca A.C., Franca E.L., Gomes M.A., Costa-Cruz J.M. (2006). Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrual leukocytes. Acta Paediatr; 95(4):438-43.

Frolov A., Miller K., Billheimer J.T., Cho T.H., Schroeder F. (1997). Lipid specificity and location of the sterol carrier protein-2 fatty acid-binding site: a fluorescence displacement and energy transfer study. Lipids. 32(11):1201-9.

Frolov A., Schroeder F. (1997). Time-resolved fluorescence of intestinal and liver fatty acid binding proteins: Role of fatty acyl CoA and fatty acid. *Biochemistry* 36: 505-517.

Fujii S., Kawaguchi H., Yasuda H. (1987). Purification of High Affinity Fatty Acid Receptors in Rat Myocardial Sarcolemmal Membranes. *Lipids* 2: 544-546.

Garcia-Olmedo F., Molina A., Segura A., Moreno M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 3(2):72-4.

Gazder A.J., Banerjee M. (1978). Single dose therapy of giardiasis with tinidazole and metronidazole. *Drugs.* 15 Suppl 1:30-2.

Gibson G.R., Ramirez D., Maier J., Castillo C., Das S. (1999). *Giardia lamblia*: incorporation of free and conjugated fatty acids into glycerol-based phospholipids. *Exp Parasitol.* 92(1):1-11.

Gilbert R., Thompson Robert K., Ockner, Kurt J. Isselbacher. (1969). Effect of mixed micellar lipid on the absorption of cholesterol and vitamin D₃ into lymph. *J Clin Invest.* 48(1): 87-95.

Gillin F.D., Reiner D.S., Wang C.S. (1983). Killing of *Giardia lamblia* trophozoites by normal human milk. *J. Cell Biochem.* 23: 47-56.

Girard C., Dereure O., Blatiere V., Guillot B., Bessis D. (2006). Vitamin a deficiency phrynodema associated with chronic giardiasis. *Pediatr Dermatol;* 23(4):346-9.

Glatz J.F.C., Baerwaldt C.C.F., Veerkamp J.H. (1984). Diurnal Variation of cytosolic fatty acid-binding protein content and of palmitate oxidation in rat liver and heart. *Americ. Soc. Biol. Chem. Inc.* 259 (7): 4295-4300.

Glatz J.F.C., Borchers T., Spener F., Van der Vusse G.J. (1995). Fatty acid in cell signalling : Modulation by lipid binding proteins. *Prostagland. Leukotr. Ess. Fatty Acids* 52: 121-127.

Glatz J.F.C., Haastrup B., Hermens W.T., De Zwaan C., Barker J., Me Neil C.J., Adams P., Lucher M., Ruvkilde J., Thygesen K., Kristensen S., Horder M. (1997). Fatty acid binding protein and the early detection of acute myocardial infarction. The EUROCARDI multicenter trail. *Circulation Suppl.* I-215 (abstr).

Glatz J.F.C., Van Breda E., Keizer H.A., De Jong Y.F., Lakey J.R.T., Rajotti R.V., Thompson A., Van der Vusse G.J., Lopaschuk G.D. (1994). Rare heart fatty acid binding protein content is increased in experimental diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199: 639-646.

Glatz J.F.C., Van der Vusse G.J. (1996). Cellular fatty acid-binding protein: Their function and physiological significance. *Prog. Lipid Res.* Vol. 35, No. 3, pp. 243-282.

Glatz J.F.C., Van der Vusse G.J., Veerkamp J.H. (1988). Fatty acid binding proteins and their significance. *News Physiol. Sci.* 3: 41-43.

Glatz J.F., Veerkamp J.H. (1985). Intracellular fatty acid-binding proteins. *Int J Biochem.* 17(1):13-22.

Glatz J.F.C., Vork M.M., Van der Vusse G.J. (1993b). Significance of cytoplasmic fatty acid binding protein for the ischemic heart. *Mol. Cell. Biochem.* 123: 167-173.

Glatz J.F.C., Vork M.M., Cistola D.P., Van der Vusse G.J. (1993a). Cytoplasmic fatty acid-binding protein: Significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 48: 3341-3349.

Gobert G.N. (1998). Immunolocalization of Schistosome Proteins, *Mic. Res. And Tech.* 42(3), 167-185.

Gobert G.N., Stenzel D.J., Jones M.K., McManas D.P. (1997). Immunolocalization of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* 115: 33-39.

Goka A.K.J., Rolston D.D.K., Mathan V.I., Farthing M.J.G. (1986). Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 2: 184-186.

Goodman L.S., Gilman A. (1985). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McMillan, New York. P.1052-1057.

Gottstien B., Nash T.E. (1991). Antigenic variation in *Giardia lamblia*: infection of congenitally athymic nude and said mice. *Parasite Immunol.* 13: 649-659.

Greenwalt D.E., Lipsky R.H., Ockenhouse C.F., Ikeda H., Tandon N.N., Jamieson G.A. (1992). Membrane Glycoprotein CD36: A Review of its Role in Adherence, Signal transduction and Transfusion Medicine. *Blood* 80: 1105-1115.

Groll A. (1977). Symposium on diarrhea. 3. Investigation of chronic diarrhea. *Can Med Assoc J.* 116(7):742-4.

Guy R.A., Xiao C., Horgen P.A. (2004). Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 42(7):3317-3320.

Hall A. (1994). *Giardia* infection: Epidemiology and nutritional consequence. En, *Giardia* from molecules to disease (Thompson R.C.A., Reynoldson J.A., Lymbery A.J., eds) , p. 251-279.

Halliday C.F.W., Inge P.M.G., Farthing M.J.G. (1988). *Giardia* bile salt interaction in vitro and in vivo. *Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 82, 428-432.

Harmon C.M., Luce P., Beth A.H., Abumrad N.A. (1991). Labelling of Adipocyte Membrane by Sulfo-N-succinimidyl Derivatives of Long-chain Fatty Acids: Inhibition of Fatty Acid Transport. *J. Membrane Biol.* 121: 261-268.

Hartong W.A., Gourley W.K., Arvanitakis C. (1979). Giardiasis: Clinical spectrum and functional-structural anomalies of the small intestinal mucosa. *Gastroenterology* 77, 61-69.

Hasan S., Diaz de la Guardia R., Maasse M., Cordova O., Mascaró M.C., D.Acuña, Osuna A. (2002a). Isolation and purification of a fatty acids binding protein in *Giardia*. *Rev and Rew in Parasitol.* 62:323-342.

Hasan S., M. Maachee, O. Córdoba, R. Diaz de la Guardia, M. Martins, A.Osuna. (2002b). Human Secretory Immune Response to Fatty Acid-Binding Protein Fraction from *Giardia lamblia*. *Infect and Immunity* 70(4): 2226-2229.

Hasan S.M.T., M. Maache, R. Díaz de la Guardia, O. M. Córdoba, J. R. Gil García, M. Galiana, D. Acuña Castroviejo, M. Martins, Antonio Osuna. (2005). Binding properties and immunolocalization of a fatty-acid-binding protein in *Giardia lamblia*. *The Journal of Parasitology* Aceptado para su publicación.

Hebsgaard S.M., Korning P.G., Tolstrup N., Engelbrecht J., Rouze P., Brunak S. (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No. 17, 3439-3452.

Heikkinen M., Pikkarainen P., Takala J., Rasanen H., Julkunen R. (1995). Etiology of dyspepsia: four hundred unselected consecutive patients in general practice. *Scand J Gastroenterol.* 30(6):519-23.

Heukeshoven J., Dernick R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6, 103-112.

Heyworth M.F. (1989). Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J. Parasitol.* 75: 246-251.

Heyworth M.F. (1992). Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J. Parasitol.* 78: 73-76.

Heyworth M.F. (1996). *Giardia* infections. In: Paradise I J et al., editors. *Enteric infections and immunity*. New York: Plenum Press, 227-38.

Heyworth M.F., Pappo J. (1990). Recognition of a 30,000 MW antigen of *Giardia muris* trophozoites by intestinal IgA from *Giardia*-infected mice. *Immunology* 70: 535-539.

Heyworth M.F., Carlson J.R., Ermak T.H. (1987). Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165: 1743-1798.

Heyworth M.F., Kung J.E., Eriksson E.C. (1986). Clearance of *Giardia muris* infection in mice deficient in natural killer cells. *Infect. Immun.* 55: 3155-3161.

Hill D.R. (1990a). Lymphocyte proliferation in Peyer's patches of *Giardia muris*-infected mice. *Infect Immun.* 58(8):2683-5.

Hill D.R., Pearson R.D. (1987). Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 55(12): 3155-61.

- Hill D.R., Pohl R. (1990b). Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by murine Peyer's patch macrophages. *Infect. Immun.* 58: 3202-3207.
- Hillyer, G.V. (2005). Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J Helminthol.* 79(3):241-7.
- Hillyer G.V. (1995). Comparison of purified 12 kDa and recombinant 15 kDa Fasciola hepatica antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90(2):249-53.
- Hiltbold A., Frey M., Hülsmeier A., Köhler P. (2000). Glycosylation and palmitoylation are common modifications of *Giardia* variant surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109: 61-65.
- Hodsdon M.E., Cistola D.P. (1997). Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of Apo intestinal fatty acid-binding protein: Implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry* 36, 1450-1460.
- Hopkins R.S., Juranek D.D. (1991). Acute giardiasis: an improved clinical case definition for epidemiologic studies. *Amer. J. of Epid.* 133, 402-407.
- Inge P.M.G., Edson C.M., Farthing M.J.G. (1988). Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut* 29: 795-801.
- Ishimitsu T., Ohta S., Saito M., Teranishi M., Inada H., Yoshii M., Minami J., Omo H., Hikawa A., Shibata N., Sugaya T., Kamijo A., Kimura K., Ohru M., Matsuoka H. (2005). Urinary excretion of liver fatty acid-binding protein in health-check participants. *Clin Exp Nephrol.* 9(1): 34-9.
- Jakoby M.G., Miller K.R., Toner J.J., Bauman A., Cheng L., Li, E., Cistola D.P. (1993). Ligand-protein electrostatic interactions govern the specificity of retinol and fatty acid-binding proteins. *Biochem.* 32: 872-878.
- Jakubowski W. (1990). The control of *Giardia* in water supplies. In: Meyer, E.A., editor. *Giardiasis*. Amsterdam: Elsevier Science. 335-53.
- Jamison R.S., Newcomer M.E., Ong D.E. (1994). Cellular retinoid-binding proteins: limited proteolysis reveals a conformational change upon ligand binding. *Biochemistry.* 33(10):2873-9.

Janoff, E.N., Smith, P.D. (1990). The role of immunity in *Giardia* infections. In: *Giardiasis* (E.A. Meyer. ed.). Amsterdam: Elsevier Science. p: 215-233.

Janoff E.N., Craft J.C., Pickering L.K., Novotny T., Blaser M.J., Knisley C.V., Reller L.B. (1988). Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. *J. Clin. Microbiol.* 27: 431-435.

Janssen D., Barrett J. (1995). A novel lipid-binding protein from the cestode *Moniezia expansa*. *Biochem J.* 311 (Pt 1):49-57.

Jarroll E.L., Muller P.J., Meyer E.A., Morse S.A. (1981). Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 2(3-4):187-96.

Jarroll E.L., Manning P., Berrada A., Hare D., Lindmark D.G. (1989). Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *J Protozool.* 36(2):190-7.

Jarroll E.L., Hoff J.C., Meyer E.A. (1984). Resistance of cysts to disinfection agents. In: Erlandsen, S.L. and Meyer, E.A. (eds), *Giardia and giardiasis*. Plenum Press, New York, pp. 311-328.

Jolly C.A., Hubbell T., Behnke W.D., Schroeder F. (1997). Fatty acid binding protein: stimulation of microsomal phosphatidic acid formation. *Arch Biochem Biophys.* 341(1):112-21.

Julie E.J. Nixon, Amy Wang, Hilary G. Morrison, Andrew G. McArthur, Mitchell L. Sogin, Brendan J. Loftus, John Samuelson. (2002). A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(6):3701-5.

Kader S.A., Mansour A.M., Mohran Z., el-Taouil A., Abdalla K.F. (1998). A study on the relation between proton pump inhibitor and gastric giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol.* 28(1):149-57.

Kaikaus R.M., Bass N.M., Ockner R.K. (1990). Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia.* 46(6):617-30.

Kang J.X., Leaf A. (1996). Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 3542-3546.

Kaplan B., Altmanshofer D. (1985). *Giardia muris* adherence to intestinal epithelium, the role of specific anti-*Giardia* antibodies. Microecol. Ther. 15: 133-140.

Kaptein W.A., Korf J., Cheng S., Yang M., Glatz J.F.C., Renneberg R. (1998). On-line flow displacement immunoassay for fatty acid binding protein. J. Immunolog. Methods. 217: 103-111.

Katelaris P.H., Naeem A., M.J.G. Farthing. (1995). Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. Gut 37: 512-518.

Katelaris P.H., Farthing M.J.G. (1992). Diarrhoea and malabsorption in giardiasis: A multifactorial process. Gut. 33, 295-297.

Katelaris P.H., Seow F., Ngu M.C. (1991). The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on lipolysis in vitro. Parasitology 103, 35-39.

Keeling P.J., Brugerolle G. (2006). Evidence from SSU rRNA phylogeny that Octomitus is a sister lineage to *Giardia*. Protist. 157(2):205-12.

Keister D.B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 487-488.

Kennedy M.W., Scott J.C., Lo S., Beauchamp J., McManus D.P. (2000). Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue. Biochem J. 349(Pt 1):377-84.

Khan S.H., Sorof S. (1990). Preferential binding of growth inhibitory prostaglandins by the target protein of a carcinogen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Dec;87(23):9401-5.

Kiens B., Kristiansen S., Jensen P., Richter E.A., Turcotte L.P. (1997). Membrane associated fatty acid-binding protein in human skeletal muscle is increased by endurance training. Bioch. and Bioph. Res. Com. 231: 463-465.

Kirill A., Datsenko, Barry L. Wanner. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA. 97(12): 6640-6645.

Klebe R.J., Grant G.M., Grant A.M., Garcia M.A., Giamb Bernardi T.A., Taylor G.P. (1996). RT-PCR without RNA isolation. *Biotechniques*. 21(6): 1094-100.

Kolisko M., Cepicka I., Hampl V., Kulda J., Flegr J. (2005). The phylogenetic position of enteromonads: a challenge for the present models of diplomonad evolution. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55(Pt 4):1729-33.

Korman S.H., Bar-Oz B., Mandelberg A., Matoth I. (1990). Giardiasis with protein-losing enteropathy: Diagnosis by fecal al-antitrypsin determination. *J. of Pediat. Gastr. and Nut.* 10, 249-252.

Kruchten A.E., Bennaars-Eiden A., Ross J.R., Shen W.J., Kraemer F.B. (2003). Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. Bernlohr DA. *J Biol Chem*. 278, 47636-47643.

Kuby J. (1997). *Immunology*. De W.H. Freeman and Co., New York. P. 474-478.

Kulakova L., Singer S.M., Conrad J., Nash TE. (2006). Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia Lamblia* antigenic variation. *Mol Microbiol*; 61(6): 1533-42.

Kurian E., Kirk W.R., Prendergast F.G. (1996). Affinity of fatty acid for (r)rat intestinal fatty acid binding protein: further examination. *Biochemistry*. 35(12):3865-74.

Kurtz A., Zimmer A., Schnutgen F., Bruming G., Spener F., Muller T. (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlated with neuronal and glial cell. *Development* 120: 2637-2649.

Lacey E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* 6, 112-115.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Natur*. 227, 680-685.

Lalonde J.M., Bernlohr D.A., Banaszak L. (1994). Adipocyte lipid-binding protein complexes arachidonic: titration calorimetric and X-ray crystallographic studies. *J. Biol. Chem*. 269: 339-347.

Lauriere M. (1993). A semidry electrophoresis system efficiently transfers both high- and low-molecular weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal. Biochem.* 212: 206-211.

Lee J., Jiao X., Hejtmancik J.F., Kaiser-Kupfer M., Chader G.J. (1998). Identification, isolation, and characterization of a 32-kDa fatty acid-binding protein missing from lymphocytes in humans with Bietti crystalline dystrophy (BCD). *Mol Genet Metab.* 65(2): 143-54.

Lee J.S., Kim I.S., Sohn W.M., Lee J., Yong T.S. (2006). A DNA vaccine encoding a fatty acid-binding protein of *Clonorchis sinensis* induces protective immune response in Sprague-Dawley rats. *Scand J Immunol*; 63(3): 169-76.

Lev B., Ward H., Keusch G.T., Pereira M.E.A. (1986). Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease. A novel host-parasite interaction. *Science* 232, 713.

Levy D.A., Bens M.S., Craun G.F., Calderon R.L., Herwaldt B.L. (1998). Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1995-1996. *MMWR CDC Surveill Summ.* 47(5):1-34.

Li E., Zhou P., Petrin Z., Singer S.M. (2004). Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.* 72(11):6642-6649.

Liu Z.Q., Sun Z.H. (2005). Cloning and expression of *Fusarium moniliforme* CGMCC 0536 D-lactonohydrolase gene in *Escherichia coli*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 21(3): 390-5.

LoGalbu P.R., Sampson H.A., Buckley R.H. (1982). Symptomatic giardiasis in three patients with χ -linked agammaglobulinemia. *J. Pediatr.* 101: 78-80.

Lortaine P., Turcotte, Ashok K., Srivastava, Jean-Louis Chiasson (1997). Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP) in red skeletal muscle. *Mol. and Cell. Bioch.* 166: 153-158.

Lucke C., Qiao Y., van Moerkerk H.T., Veerkamp J.H., Hamilton J.A. (2006). Fatty-acid-binding protein from the flight muscle of *Locusta migratoria*: evolutionary variations in fatty acid binding. *Biochemistry*; 45(20): 6296-305.

- Luiken J.J., Schap F.G., Van Nieuwenhoven F.A., Van der Vusse G.J., Bonen, A., Glatz, J.F. (1999). Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 34: S 169-175.
- Lujan H.D., Mowatt M.R., Nash T.E. (1996). Lipid requirements and lipid uptake by *Giardia lamblia* trophozoites in culture. *J Eukaryot Microbiol.* 43(3):237-42.
- Lujan H.D., Marorta A., Mowatt M.R., Sciaky N., Lippincott-Schwartz J., Nash T.E. (1995a). Development induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 270: 4612-18.
- Luxon B.A., Weisiger R.A. (1993). Sex differences in intracellular fatty acid transport: role of cytoplasmic binding proteins. *Am J Physiol.* 265(5 Pt 1):G831-41.
- Luxon B.A. (1996). Inhibition of binding to fatty acid binding protein reduces the intracellular transport of fatty acids. *Am J Physiol.* 271(1 Pt 1):G113-20.
- Lynne Shore Garcia. *Diagnostic Medical Parasitology* ASM Press. Washington. (2001).
- Maache M., Azzouz S., Díaz de la Guardia R., Álvarez P., Gil R., de Pablos L.M., Osuna A. (2005). Host humoral immune response to *Leishmania* lipid-binding protein. *Parasite Immunol.* 27(6):227-34.
- Maciorkowska E., Kaczmarek M., Kemon A. (2006). The role of cytokines in giardiasis in children. *Med Wieku Rozwoj;* 9(4): 665-73.
- Maggiolini M., Donze O., Picard D. (1999). A non-radioactive method for inexpensive quantitative RT-PCR. *Biol Chem ;* 380(6):695-7.
- Mandour A.M., Ahdel Rahman A.M., Hassan H.A., Mohamed M.A. (1984). *Giardia lamblia* as a cause of malabsorption and hypovitaminosis "A" in children. *J. of Egypt. Soc. for Parasitol.* 14, 203-206.
- McDonnell D.P., Clemm D.L., Hermann T., Goldman M.E., Pike J.W. (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol.* 9(6):659-69.
- Meyer E.A. (1990). Introduction. In: *Giardiasis* (Meyer, E.A., editor). Amsterdam: Elsevier Science. p. 1-9, 51-60.

Meyers J.D., Kuharic H.A., Holmes K.K. (1977). *Giardia lamblia* infection in homosexual men. British Journal of Venerology 53: 54-55.

Miotti P.G., Gilman R.H., Pickering L.K., Ruiz-Palacios G., Park H.S., Yolken R.H. (1985). Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. J. Infect. Dis. 152: 1025-1031.

Mogensen I.B., Schulenberg H., Hansen H.O., Spener F., Knudsen J. (1987). A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. Biochem J. 241(1):189-92.

Morrison H.G., McArthur A.G., Adam R.D., Aley S.B., Gillin F.D., Olsen G.J., Sogin M.L. (2003). Draft sequence of the *Giardia lamblia* genome. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

Morrison H.G., Zamora G., Campbell R.K., Sogin M.L. (2002). Inferring protein function from genomic sequence: *Giardia lamblia* expresses a phosphatidylinositol kinase-related kinase similar to yeast and mammalian TOR. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 133(4):477-91.

Moser D., Tendler M., Griffiths G., Klinkert M.Q. (1991). A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. J Biol Chem. 266(13):8447-54.

Müller N., Gottstein B. (1998). Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. Intern. J. for Parasitology 28: 1829-1839.

Müller N., Stäger S. (1999). Periodic appearance of a predominant variant antigen type during a chronic *Giardia lamblia* infection in a mouse model. Intern. J. for Parasitol. 29: 1917-1923.

Müller N., von Allmen N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. Int J Parasitol. 35(13):1339-47.

Murphy E.J., Edmondson R.D., Russell D.H., Colles S., Schroeder F. (1999). Isolation and characterization of two distinct forms of liver fatty acid binding protein from rat. Bioch. Biophys. Acta 1436, 413-425.

- Nain C.K., Dutt P., Vinayak V.K. (1991). Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 85(5):515-22.
- Nambi P.A., Yadav S.C., Raina O.K., Sriveny D., Saini M. (2005). Vaccination of buffaloes with *Fasciola gigantica* recombinant fatty acid binding protein. *Parasitol Res.* 97(2):129-35.
- Narayanan V., Barbosa E., Reed R., Tennekoon G. (1988). Characterization of a cloned cDNA encoding rabbit myelin P2 protein. *J Biol Chem;* 263(17):8332-7.
- Nash T.E. (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 352: 1369-1375.
- Nash T.E., Mowatt M.R. (1992). Characterization of *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51: 219-228.
- Nash T.E., Aggarwal A., Adam R.D., Conrad J.T., Merritt J.W. (1988). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* 141: 636-641.
- Nash T.E., Banks S.M., Alling D.W., Merritt J.W., Conrad J.T. (1990a). Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* 71: 415-421.
- Nash T.E., Herrington D.A., Levine M.M., Conrad J.T., Merritt J.W. (1990b). Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J. Immunol.* 144: 4362-4369.
- Nash T.E., Herrington D.A., Levine M.M. (1987a). Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. *J Clin Microbiol.* 25(7):1169-1171.
- Nash T.E., Merritt J.W., Conrad J.T. (1991). Isolated and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect. Immun.* 59: 1334-1340.
- Nayak N., Ganguly N.K., Walia V., Kanwar S.S., Mabajan R.C. (1987). Specific secretory IgA in the milk of *Giardia lamblia*-infected and uninfected woman. *J. Infect. Dis.* 155: 724-727.

- Ockner R.K., Manning J.A., Poppenhausen R.B., Ho W.K.L. (1972a). A binding protein for fatty acid in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. *Science* 177: 56-58.
- Ockner R.K., Manning J.A., Poppenhausen R.B., Ho W.K. (1972b). A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. 177(43):56-8.
- Ockner R.K. (1990). Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins. *Mol Cell Biochem*. 98(1-2):3-9.
- Offner G.D., Troxler R.F., Brecher P. (1986). Characterization of a fatty acid-binding protein from rat heart. *J Biol Chem*. 261(12):5584-9.
- Owen R.L., Allen C.L., D.F. Stevens.(1981). Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infect. Immunity* 33: 591-601.
- Paget T.A., Raynor M.H., Shipp D.W., Lloyd D. (1990). *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. *Mol Biochem Parasitol*. 42(1):63-7.
- Paget T.A., Kelly M.L., Jarroll E.L., Lindmark D.G., Lloyd D. (1993). The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*. 57(1):65-71.
- Papanastasiou P., Bruderer T., Li. Y., Bommeli C., Cöhler P. (1997a). Primary structure and biochemical properties of a variant specific surface protein of *Giardia* . *Mol. Biochem. Parasitol*. 86: 13-27.
- Papanastasiou P., McConville M.J., Ralton J., Cöhler P. (1997b). The variant specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochem. J*. 322: 49-56.
- Patricia J. Johnson. (2002). Spliceosomal introns in a deep-branching eukaryote: The splice of life. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(6): 3359-61.
- Paulussen R.J.A., Van der Logt C.P.E., Veerkamp J.H. (1988). Characterization and binding properties of fatty acid binding protein from human, pig and rat heart. *Arch. Biochem. Biophys*. 264: 533-545.
- Pecters R.A., Veerkamp J.H. (1989). Does fatty acid binding protein play a role in fatty acid transport. *Mol. Cell. Biochem*. 88: 45-49.

- Peters T.Jr., Taniuchi H., Anfinsen C.B.Jr. (1973). Affinity chromatography of serum albumin with fatty acids immobilized on agarose. *J Biol Chem.* 248(7): 2447-51.
- Petro T.M., Watson R.R., Feely D.E., Darban H. (1992). Suppression of resistance to *Giardia muris* and cytokine production in a murine model of acquired immune deficiency syndrome. *Regul. Immunol.* 4: 409-414.
- Price H.M., Ryan R.O., Haunerland N.H. (1992). Primary structure of locust flight muscle fatty acid binding protein. *Arch Biochem Biophys.* 297(2): 285-90.
- Reiner D.S., Wang C.S., Gillin F.D. (1986). Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *J. Infect. Dis.* 154: 825-831.
- Reynolds J.A., Tanford C. (1970). *J. Biol. Chem.* 234: 5161-5165.
- Rice E.W., Hoff J.C., Schaefer F.W. (1982). Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine. *Applied Enviro. Microb.* 43: 250-251.
- Rice P., Longden I., and Bleasby A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16, (6) pp276-277.
- Richiere G.V., Ogata R.T., Kleinfeld A.M. (1994). Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid binding proteins from adipocyte, intestine, heart and liver measured with the fluorescence probe ADJFAB. *J. Biol. Chem.* 269: 23918-23920.
- Rikers J., Tober J., Spener F. (1984). Purification and binding characteristics of a basic fatty acid binding protein from *Avena sativa*. *Biochemical Biophysic Acta* 794: 313–319.
- Robert K., Ockner, Joan A. Manning. (1974). Fatty Acid-Binding Protein in Small Intestine IDENTIFICATION, ISOLATION, AND EVIDENCE FOR ITS ROLE IN CELLULAR FATTY ACID TRANSPORT. *J Clin invest.* 54(2):326-338.
- Rolf B., Oudenampsen-Kruger E., Borchers T., Faergeman N.J., Knudsen J., Lezius A., Spener F. (1995). Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 1259(3):245-53.

Rosales-Borjas D.M., Díaz-Rivadweyera J., Doña-Leyva A., Zambrano-Villa S.A., Mascaró C., Osuna A., Ortiz-Ortiz L. (1998). Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infection and Immunity*, Vol. 66, No. 2: 756-759.

Rose H., Hennecke T., Kammermeier H. (1990). Sarcolemmal fatty acid transfer in isolated cardiomyocytes governed by albumin/membrane-lipid partition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22: 883-892.

Salinovich O., Montelaro R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 156(2): 341-7.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schaffer J.E., Londish H.F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79: 427-436.

Schmitt M.C., Jamison R.S., Orgebin-Crist M.C., Ong D.E. (1994). A novel testis-specific membrane of the cellular lipophilic transport protein super family, deduced from a complementary deoxyribonucleic acid clone. *Biol. Reprod.* 51: 239-249.

Schroeder F., Jefferson J.R., Powell D., Incerpi S., Woodford J.K., Colles S.M., Myers-Payne S., Emge T., Hubbell T., Monecchi D., Prows D.R., Heyliger C.E. (1993). Expression of rat L-FABP in mouse fibroblasts: Role in fat absorption. *Mol. Cell. Biochem.* 123: 78-83.

Servonnet A., Delacour H., Dehan C., Gardet V. (2006). [Heart fatty-acid binding protein (h-FABP): a new cardiac marker]. *Ann Biol Clin (Paris)*; 64(3): 209-17.

Schwieterman W., Sorrentino D., Potter B.J., Rand J., Kiang C.L., Stump D., Berk P.D. (1988). Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40 kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 85: 359-363.

- Sha R.S., Kane C.D., Xu Z., Banaszak L.J., Bernlohr D.A. (1993). Modulation of ligand binding affinity of the adipocyte lipid-binding protein by selective mutation. Analysis *in vitro* and *in situ*. *J. Biol. Chem.* 268: 7885-7892.
- Simmonds W.J., Redgrave T.G., Willix R.L. (1968). Absorption of oleic and palmitic acids from emulsions and micellar solutions. *J Clin Invest.* 47(5):1015-25.
- Smith P.D., Elson C.O., Keister D.P., Nash T.E. (1982). Human host response to *Giardia lamblia*. I Spontaneous killing by mononuclear leukocytes *in vitro*. *J. Immunol.* 128: 1371-1376.
- Smith P.D., Gillin F.D., Brown W.R., Nash T.E. (1981). IgG antibody to *Giardia lamblia* detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterology* 80: 1476-1480.
- Smooker P.M., Hickford D.E., Vaiano S.A., Spithill T.W. (1997). Isolation, cloning, and expression of fatty-acid binding proteins from *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol.* 85(1):86-91.
- Snide D.P., Underdown B.J. (1986). Quantitative and temporal analysis of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. *Infect. Immun.* 52: 271-278.
- Soliman M.M., Taghi-Kilani R., Abou-Shady A.F., El-Mageid S.A., Handousa A.A., Hegazi M.M., Belosevic M. (1998). Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 58(2):232-239.
- Sorof S. (1994). Modulation of mitogenesis by liver fatty acid binding protein. *Canc. Metast. Rev.* 13: 317-336.
- Sorrentino D., Stump D., Potter B.J., Robinson R.B., White R., Kiang C.L., Berk P.D. (1988). Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40 kDa plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue and gut. *J. Clin. Invest.* 82: 928-935.
- Sousa M.C., Gonçalves C.A., Bairos V.A., Poiars-da-Silva J. (2001). Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cell Line. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 258-265.

- Sousa M.C., Poiares-da-Silva J. (2001). The cytotoxic effects of ciprofloxacin in *Giardia lamblia* trophozoites. *Toxicol. in Vitro.* 15: 297-301.
- Southern E.M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem.* 62(1):317-8. No abstract available.
- Speelman P., Ljungstrom I. (1986). Protozoal infections among expatriates in Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 1140-1145.
- Stäger S., Felleisen R., Gottstein B., Müller N. (1998a). *Giardia lamblia* variant surface protein H7 stimulates a heterogeneous repertoire of antibodies displaying differential cytological effects on the parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85: 113-124.
- Stäger S., Gottstein B., Sager H., Jungi T.W., Müller N. (1998b). Influence of antibodies in mother's milk on antigenic variation of *Giardia lamblia* in the murine mother-offspring model of infection. *Infect. Immun.* 66: 1287-1292.
- Staffan G. Svärd ^{a,b,*}, Per Hagblom ^{a,b}, J.E. Daniel Palm ^{a,b}. (2003). *Giardia lamblia* – a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters.* 218 3-7.
- Steiner T.S., Thielman N.M., Guerrant R.L. (1997). Protozoal agents: what are the danger for the public water supply?. *Annu. Rev. Med.* 48:329-340.
- Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1996, 1997, 1998). Primer3. Code available at.
- Stevens T.L., Gibson G.R., Adam R., Maier J., Allison-Ennis M., Das S. (1997). Uptake and cellular localization of exogenous lipids by *Giardia lamblia*, a primitive eukaryote. *Exp Parasitol.* 86(2):133-43.
- Stewart J.M., Driedzic W.R., Berkelaar J.A. (1991). Fatty-acid-binding protein facilitates the diffusion of oleate in a model cytosol system. *Biochem J.* 275 (Pt 3):569-73.
- Storch J., Bass N.M., Kleinfeld A.M. (1989). Studies of the fatty acid binding site of the rat liver fatty acid binding protein using fluorescent fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264: 8708-8713.

Storch J., Veerkamp J.H., Hsu K.T. (2002). Similar mechanisms of fatty acid transfer from human and rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle, and adipose tissue FABPs. *Mol Cell Biochem.* 239(1-2):25-33.

Stremmel W., Strohmeyer G., Borchard F., Kochwa S., Berk P.D. (1985a). Isolation and Partial Characterization of a Fatty Acid Binding Protein in Rat Liver Plasma Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4-8.

Stremmel W., Lotz G., Strohmeyer G., Berk P.D. (1985b). Identification, Isolation and Partial Characterization of a Fatty Acid Binding Protein from Rat Jejuna Microvillous Membranes. *J. Clin. Invest.* 75: 1068-1076.

Stremmel W. (1988). Fatty Acid Uptake by Isolated Rat Heart Myocytes Represents a Carrier-mediated Transport System, *J. Clin. Invest.* 8: 844-853.

Stremmel W., Kleinert H., Fitscher B.A., Gunawan J., Klaassen-Schluter C., Moller K., Wegener M. (1992). Mechanism of cellular fatty acid uptake. *Biochem Soc Trans.* 20(4):814-7.

Stump D.D., Zhou S.L., Berk P.D. (1993). Comparison of Plasma Membrane FABP and Mitochondrial Isoform of Aspartate Aminotransferase from Rat Liver. *Ann. J. Physiol.* 265, G894-G902.

Sugaya N., Otsuka J. (2002). The lineage-specific base-pair contents in the stem regions of ribosomal RNAs and their influence on the estimation of evolutionary distances. *J Mol Evol.* 55(5):584-94.

Taylor G.D., Wenman W.M. (1987). Human immune response to *Giardia lamblia*. *Infect. Dis.* 155: 137-140.

Tchang F., Laroche-Raynal M., Vergnolle C., Demandre C., Douady D., Grosbois M., Guerbette F., Delseny M., Kader J.C. (1985). In vitro synthesis of a plant phospholipid transfer protein: a study by high performance liquid chromatography. *Biochem Biophys Res Commun.* 133(1):75-81.

Tejuca M., Anderluh G., Macek P., Marcet R., Torres D., Sarracent J., Alvarez C., Lanio M.E., Serra M.D., Menestrina G. (1999). Antiparasite activity of sea-anemone cytolytic toxins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-*Giardia* antibodies. *Intern. J. Parasitol.* 29: 489-498.

Thomas G.E., Goldsmid J.M., Wicks A.C. (1974). Use of the enterotest duodenal capsule in the diagnosis of giardiasis. A preliminary study. S Afr Med J. 48(53):2219-2220.

Tipping E., Ketterer B. (1981). The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes. Biochem J. 1;195(2):441-52.

Tomkins A.M., Drasar B.S., Bradley A.K., Williamson W.A. (1987). Bacterial colonization of jejuna mucosa in giardiasis. Trans. of Roy. Soc. of Trop. Med. 72, 33-36.

Towbin H., Stachelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

Trevaskis N.L., Lo C.M., Ma L.Y., Tso P., Irving H.R., Porter C.J., Charman W.N. (2006). An Acute and Coincident Increase in FABP Expression and Lymphatic Lipid and Drug Transport Occurs During Intestinal Infusion of Lipid-Based Drug Formulations to Rats. Pharm Res. [Epub ahead of print].

Trigatti B.L., Marrgroo D., Gerber G.E. (1991). Photoaffinity labelling and fatty acid permeation in 3T3-LI adipocytes. J. Biol. Chem. 266: 22621-22625.

Troeger H., Epple H.J., Schneider T., Wahnschaffe U., Ullrich R., Burchard G.D., Jelinek T., Zeits M., Fromm M., Schulzke. (2006). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut. 100198v1.

Underdown B.J., Skea D.L., Loney G.M., Snider D.P. (1988). Murine giardiasis and mucosal immunity: a model for the study of immunity to intestinal protozoan parasites. Monogr. Allergy 24: 287-296.

Upcroft J.A., Campbell, R.W., Upcroft, P. (1996). Quinacrine-resistant *Giardia duodenalis*. Parasitology 112: 309-313.

Van der Vusse G.J., Glatz J.F., Stam H.C., Reneman R.S. (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. Physiol Rev. 72(4):881-940.

- Van Nieuwenhoven F.A., Van der Vusse G.J., Glatz J.F.C. (1996). Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Lipids*. Vol. 31, S-223-227.
- Veerkamp J.H., Peerers R.A., Maauman R.G.H. (1991). Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid binding proteins. *J. Biochem. Biophys. Acta*. 1081: 1-24.
- Veerkamp J.H., Van Moerkerk H.T.B. (1993). Fatty acid binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol. Cell. Biochem*. 123: 101-106.
- Veerkamp J.H. (1995). Fatty acid transport and fatty acid-binding proteins. *Proc Nutr Soc*. 54(1):23-37.
- Veerkamp J.H., Van Moerkerk H.T.B., Zimmerman A.W. (2000). Effect of fatty acid-binding proteins on intermembrane fatty acid transport studies on different types and mutant proteins. *Eur J Biochem*. 267(19):5959-66.
- Venkatesan P., Finch R.G., Wakeli D. (1996). Comparison of antibody and cytokine responses to primary *Giardia muris* infection in H-2 congenic strains of mice. *Infect. Immun*. 64: 4525-4533.
- Vinayak V.K., Dutt P., Puri M. (1991). An immunoenzymatic dot-ELISA for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool eluates of clinical cases of giardiasis. *J. Immunol Methods*. 21;137(2):245-251.
- Vinayak V.K., Kumkum, Khanna R. (1989). Serum antibodies to *Giardia* surface antigens: lower titles in persistent than in non-persistent giardiasis. *J. Med. Microbiol*. 30: 207-212.
- Waggoner D.W., Bernlohr D.A. (1990). In situ labeling of the adipocyte lipid binding protein with 3-iodo-4-azido-N-hexadecylsalicylamide. Evidence for a role of fatty acid binding proteins in lipids uptake. *J. Biol. Chem*. 265: 11417-11420.
- Waggoner D.W., Manning J.A., Bass N.M., Bernlohr D.A. (1991). In situ binding of fatty acids to the liver fatty acid binding protein. Analysis using 3-[¹²⁵I] Iodo-4-Acid-N-Hexadecylsalicylamide. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 180: 407-415.
- Watanabe M., Ono T., Kondo H. (1991). Immunohistochemical study on the localizations and ontogeny of Heart fatty acid binding protein in the rat. *J. Anat*. 174: 81-95.

- Weiland M.E., Palm J.E., Griffiths W.J., McCaffery J.M., Svard S.G. (2003). Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol.* 33(12):1341-51.
- Weisiger R.A., Zucker S.D. (2002). Transfer of fatty acids between intracellular membranes: roles of soluble binding proteins, distance, and time. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282(1): G105-G115.
- Wenman W.M., Meuser R.U., Nyugen Q., Kilani R.T., El-Shewy K., Sherburne R. (1993). Characterization of an immunodominant *Giardia lamblia* protein antigen related to alpha giardin. *Parasitol. Res.* 79: 587-592.
- Wenman W.M., Meuser R.U., Wallis P.M. (1986). Antigenic analysis of *Giardia duodenalis* strains isolated in Alberta. *Can J Microbiol.* 32(12):926-9.
- Wilcox E.R., Fex J. (1992). Construction of a cDNA library from microdissected guinea pig organ of Corti. *Hear Res.* 62(1): 124-6.
- Wilson C.M. (1979). Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 96(2): 263-78.
- Woodside W.F., Heimberg M. (1978). The metabolism of oleic acid by the perfused rat liver in experimental diabetes induced by antiinsulin serum. *Metabolism.* 27(12): 1763-77.
- Wright S.G., Tomkins A.M. (1977). Quantification of the lymphocytic infiltrate in jejuna epithelium in giardiasis. *Clin. and Exp. Immunol.* 29, 408-412.
- Wyckoff M., Rodbard D., Chrambach A. (1977). Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems: properties of the stack, valid Rf- measurement, and optimized procedure. *Anal Biochem.* 78(2): 459-82.
- Xu L.Z., Sanchez R., Sali A., Heintz N. (1996). Ligand specificity of brain lipid-binding protein. *J Biol Chem.* 271(40):24711-9.

Xu Z., Bernlohr D.A., Banaszak L.J. (1993). The adipocyte lipid-binding protein at 1.6 Å resolution. Crystal structure of the apoprotein and with lipid bound saturated and unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 268: 7874-7884.

Yoshimoto K., Tanaka T., Somiya K., Tsuji K., Okamoto F., Kawamura K., Ohkaru y Asayama K., Ishii, Bhayana V., Henderson A.R. (1995). Human heart-type cytoplasm fatty acid binding protein as an indicator of acute myocardial infarction. *Biochemical markers of myocardial damage. Heart and Vessels* 10: 304-309.