

MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN PROTOZOARIOS: EL CASO DE *GIARDIA INTESTINALIS*¹

PROGRAMMED CELL DEATH IN PROTOZOA: *GIARDIA INTESTINALIS*'S CASE

² Paula C. Hernández A.

³ Jacqueline Chaparro-Olaya.

⁴ Myriam L. Velandia.

⁵ William Andrés Álvarez M.

⁶ Paola Andrea Pérez N.

Resumen

Giardia intestinalis es considerado uno de los eucariotas más antiguos y su poca complejidad representa una valiosa oportunidad para desentrañar los misterios de procesos vitales de eucariotas más complejos. Esta característica única de *G. intestinalis* y el hecho de que su genoma esté completamente secuenciado y disponible, y que todo su ciclo de vida puede ser reproducido *in vitro*, hacen de este parásito un modelo ideal para estudiar mecanismos celulares, entre ellos, la muerte celular programada.

Desde el punto de vista morfológico y molecular, la apoptosis es uno de los tipos más complejos de muerte celular programada, la cual es un proceso normal durante el desarrollo celular, y tiene un papel esencial en el control de la proliferación celular y en la respuesta a retos inmunológicos o a daños celulares. Recientemente, se ha reportado que en protozoos, entre ellos *Giardia*, podría ocurrir un tipo de muerte celular programada similar a la apoptosis y los resultados de nuestros laboratorios apoyan esta hipótesis; sin embargo, no se han identifi-

Abstract

Giardia intestinalis is an early-branching eukaryote and its low complexity represents a valuable opportunity to unravel the mysteries of essential processes in more complex eukaryotes. In addition, the genome of *G. intestinalis* is completely sequenced and its entire life cycle can be reproduced *in vitro*. All these characteristics make of *Giardia* an ideal model for studying cellular mechanisms, such as programmed cell death.

Apoptosis is one of the most complex types of programmed cell death and plays an essential role during cell development, cell proliferation and immune response. Recently it has been reported that in *Giardia* can take place events that resemble apoptosis and although our results support this hypothesis, molecules involved in this process have not yet been identified.

This review includes a description of the morphology and structure of *G. intestinalis*, its life cycle, the disease that causes and the strategies for its treatment. In addition, we

Recibido el 15/03/2012

Aprobado 06/06/2012

1. Artículo de revisión.

2. Química. MSc, PhD(c). Investigadora-Docente, Instituto de Biología Molecular, Laboratorio de Parasitología, Universidad El Bosque. hernandezpaula@unbosque.edu.co

3. Bióloga, MSc, PhD. Investigadora-Docente, Instituto de Biología Molecular. Laboratorio de Parasitología, Universidad El Bosque.

4. Licenciada en Biología. MSc. PhD. Investigadora-Docente, Instituto de Virología. Universidad El Bosque.

5. Estudiante de Licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas

6. Estudiante de Licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas

cado hasta el momento las moléculas relacionadas con los procesos de apoptosis en estos parásitos.

La presente revisión abarca una descripción de la morfología y estructura de las formas de vida de *G. intestinalis*, de su ciclo biológico, de la parasitosis que causa y de las estrategias quimioterapéuticas para su tratamiento. Asimismo, se hace un repaso de lo que hasta ahora se conoce sobre apoptosis en protozoarios, y específicamente en *G. intestinalis*, y se describen algunos resultados de nuestro grupo que apoyan la existencia de muerte celular programada en este parásito.

Palabras clave: *Giardia*, muerte celular programada, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, la muerte celular programada es un mecanismo regulado que induce la muerte celular durante la remodelación de los tejidos en desarrollo y la eliminación de células inmunitarias activas, y se caracteriza por los cambios morfológicos y moleculares que sufren las células afectadas. En algunos parásitos protozoarios se ha descrito un mecanismo similar a la apoptosis, el cual muestra algunas de las características morfológicas observadas durante la muerte celular programada de células mamíferas: la exteriorización de la fosfatidilserina, la contracción celular, la condensación de los cromosomas, la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos.

Giardia intestinalis es un parásito que ha despertado gran interés científico ya que divergió muy tempranamente y, como se considera uno de los eucariotes vivos más antiguos, es un excelente modelo para estudiar los procesos celulares básicos como la muerte celular programada. Este protozoario se incluyó recientemente en el grupo de organismos unicelulares que podrían llevar a cabo la apoptosis para inducir muerte celular programada; sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares responsables de este proceso.

GENERALIDADES DEL PARÁSITO

Taxonomía de *Giardia* spp.

Giardia spp. fue descrita en 1681 por van Leeuwenhoek, quien observó el parásito al examinar sus propias heces al microscopio. Aunque en 1859 este patógeno fue ubicado en el género *Cercomonas*, en 1882 el nombre *Giardia* fue usado por primera vez como género, y el

review what is known about apoptosis in protozoa, and specifically in *G. intestinalis*, and describe some results from our group supporting the existence of apoptosis-like programmed cell death in this parasite.

Key words: *Giardia*, programmed cell death, apoptosis.

parásito fue denominado *G. duodenalis* en 1902, *G. lamblia* en 1915 y *G. enterica* en 1920, a lo cual siguió una larga controversia sobre su denominación.

En 1952, con base en la morfología de una estructura del parásito llamada cuerpo medio, se definieron tres especies de *Giardia*: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis*. Recientemente, la clasificación taxonómica se ha basado en la morfología de los trofozoítos y divide a *Giardia* spp. en seis especies: *G. intestinalis*, *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. microti*, *G. muris* y *G. psittaci*. En estas dos clasificaciones, son *G. duodenalis* y *G. intestinalis* los nombres aceptados para las especies que infectan a los humanos (1). Así, los nombres *G. intestinalis*, *G. lamblia* y *G. duodenalis*, actualmente se usan como sinónimos para referirse a la única especie capaz de infectar al humano.

Giardiasis

Giardia intestinalis es el parásito causante de la giardiasis, una de las infecciones parasitarias más frecuentes en el mundo, con cerca de 280 millones de casos sintomáticos por año (2). La enfermedad es más frecuente en regiones tropicales y subtropicales, y especialmente prevalente en regiones afectadas por la pobreza y por bajos niveles de higiene. En estas condiciones, el parásito puede ser transmitido de persona a persona por contaminación fecal-oral, o puede adquirirse mediante el consumo de aguas no tratadas o mal desinfectadas.

La giardiasis causa diarrea acuosa, dolor epigástrico, síndrome de mala absorción, náuseas, vómito y pérdida de peso, síntomas que aparecen después de 6 a 15 días de contraída la infección. Aunque las infecciones crónicas son comunes, la mitad de ellas son asintomá-

ticas y, por lo general, se resuelven espontáneamente (3); aun así, las infecciones crónicas por *G. intestinalis* se suman al abanico de factores que dificultan el desarrollo físico y cognitivo de los niños en edad preescolar, quienes son los más afectados por esta parasitosis.

En efecto, el Instituto Nacional de Salud estableció que en Colombia la prevalencia de *G. intestinalis* es de 12 % en la población general y de 28 % en niños entre uno y cuatro años. Sin embargo, cabe señalar que en los asentamientos temporales y en las poblaciones en condiciones vulnerables como aquellas desplazadas por desastres naturales o por la violencia, se ha llegado a encontrar una prevalencia de *G. intestinalis* de hasta 60 % en la población infantil (4).

Morfología y estructura celular de *Giardia spp.*

Giardia intestinalis tiene características de células eucariotas superiores, como la presencia de núcleos, nucléolos, membrana nuclear ligada al retículo endoplásmico, citoesqueleto y vacuolas periféricas parecidas a lisosomas, pero carece de organelos como peroxisomas, aparato de Golgi y mitocondrias clásicas (1,5,6). A lo largo de su ciclo de vida, *Giardia* pasa por dos estadios claramente diferenciables, denominados trofozoíto y quiste, los cuales corresponden a las formas vegetativa e infecciosa del parásito, respectivamente.

El trofozoíto mide de 12 a 15 μm de largo y de 5 a 9 μm de ancho, y tiene forma de pera, con una superficie ventral plana y una superficie dorsal convexa; presenta dos núcleos, nucléolos, una membrana nuclear ligada al retículo endoplásmico y vacuolas periféricas parecidas a lisosomas localizadas debajo de la membrana plasmática. El citoesqueleto del trofozoíto es complejo e incluye un cuerpo medio, cuatro pares de flagelos y un disco adhesivo (figura 1), el cual le permite al parásito adherirse fuertemente a las vellosidades intestinales y evitar así ser arrastrado por los movimientos peristálticos del intestino (7).



Figura 1. Trofozoíto de *Giardia intestinalis* teñido con Giemsa. Barra 5 μm .

Por su parte, los quistes de *Giardia* son ovalados y tienen un diámetro entre 5 y 7 μm , poseen una pared gruesa e insoluble compuesta principalmente por azúcares y por las denominadas proteínas de la pared del quiste (*Cyst Wall Proteins, CWP*), CWP1, CWP2 y CWP3. En este estadio, los flagelos y el disco adhesivo están desensamblados y se observan cuatro núcleos, numerosos ribosomas y ocho axonemas asociados a dos láminas de microtúbulos (1).

Ciclo biológico de *Giardia spp.*

El proceso de diferenciación celular en *Giardia spp.* presenta dos principales transiciones de desarrollo: poco después de haber sido ingerido, el quiste sufre un proceso conocido como *excystation*, en el cual el parásito se diferencia a la forma móvil o trofozoíto. Luego, desde este estado móvil, ocurre un segundo proceso llamado enquistación, por medio del cual el parásito se diferencia a quiste y puede pasar a las heces del huésped. El proceso de diferenciación de *G. intestinalis* es uno de los procesos de desarrollo eucariota más primitivo y tiene la ventaja de que puede ser reproducido y estudiado totalmente *in vitro* (5).

La infección del huésped comienza cuando se ingiere agua o alimentos contaminados con los quistes. Después, como resultado de la exposición de los quistes al pH ácido del estómago y a las enzimas pancreáticas quimiotripsina y tripsina, la *excystation* comienza en el estómago y se completa en el duodeno. Simultáneamente, las proteasas de cisteína liberadas por el parásito ayudan a la degradación de la pared, permitiendo la liberación de los flagelos, lo cual da lugar a una forma celular con características morfológicas de transición entre el quiste y el trofozoíto verdadero (1,5,8,9). En este estadio, el parásito se reproduce asexualmente por fisión binaria, produciendo cuatro trofozoítos que, en comparación con los quistes, tienen aumentados el metabolismo, la expresión génica, el número de organelos secretores y la concentración de proteínas asociadas con la movilidad. Por último, los trofozoítos ensamblan el disco adhesivo que les permite unirse a las paredes del intestino delgado e invaden el duodeno (5,8), donde encuentran una gran concentración de nutrientes que favorecen la proliferación. Finalmente, los parásitos se multiplican y se fijan a las células del epitelio intestinal, causando el síndrome de mala absorción en los pacientes infectados (10).

A causa de los movimientos en el intestino, algunos trofozoítos se desprenden e ingresan a las porciones bajas del íleo (11), donde ocurre el proceso de enquistación gracias al pH levemente alcalino y a la presencia

de sales biliares conjugadas a ácidos grasos (1,8), los cuales hacen que la concentración de colesterol disminuya en el medio. En esta fase de enquistación, uno de los procesos clave es la biogénesis de la pared, el cual es muy coordinado y puede dividirse en tres etapas: I) recepción del estímulo de enquistación y regulación de la expresión de los genes específicos del proceso; II) síntesis, transporte intracelular y secreción de las proteínas de la pared del quiste, y III) ensamble extracelular de la pared en la superficie del trofozoito enquistante (10). Finalmente, los quistes son excretados en las heces y pueden contaminar agua y alimentos que, al ser consumidos, infectarán otro huésped humano, completando el ciclo de vida del parásito (12).

Quimioterapia contra *Giardia spp.*

Existen varios medicamentos que se han aprobado para el tratamiento de la giardiasis y los más comúnmente usados son los 5-nitroimidazoles (entre ellos el metronidazol), los derivados de los benzimidazoles (albendazol), quinacrina, furazolidona, paromomicina y la nitazoxanida. Sin embargo, algunos de estos compuestos tienen efectos colaterales importantes que afectan al paciente.

Desde finales de los años cincuenta, el metronidazol (comercialmente conocido como Flagyl®) y otros nitroimidazoles se han usado como tratamiento de elección contra la giardiasis. El metronidazol ingresa eficientemente en los trofozoitos y es activado por mecanismos de óxido-reducción que generan la reducción de su grupo nitro debido a la acción de una enzima del metabolismo anaerobio del parásito, la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa. El metronidazol reducido se une covalentemente al ADN, dañándolo, lo que lleva a la subsecuente muerte del parásito.

Aunque el metronidazol y otros nitroimidazoles eliminan eficientemente los trofozoitos de *Giardia spp.*, el tratamiento con estos medicamentos se asocia frecuentemente con la recurrencia de los síntomas. La resistencia a los fármacos puede ser una de las razones de la falla del tratamiento, pero es difícil discriminar entre resistencia, reinfección y otros efectos como, por ejemplo, los causados por la intolerancia a la lactosa. Actualmente, se sabe que ha surgido resistencia al metronidazol, característica que se ha demostrado en giardias aisladas de pacientes, y se ha logrado inducir *in vitro* (13-17).

En la actualidad, se llevan a cabo estudios con productos tanto de origen vegetal como sintéticos, con el fin de encontrar medicamentos más eficaces, con pocas reacciones colaterales y que puedan, si es

posible, ser efectivos en dosis únicas (18). Dada la alta prevalencia de este patógeno entérico y las limitadas opciones de tratamiento, es importante encontrar nuevos blancos quimioterapéuticos y nuevos fármacos que tengan una potencia mejorada.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA: LA APOPTOSIS

La muerte celular programada es uno de los procesos celulares más interesantes desde el punto de vista adaptativo y desempeña un papel crucial en el desarrollo, la homeostasis y la regulación inmunitaria en los organismos multicelulares. Existen diferentes tipos de muerte celular programada y, entre ellos, la apoptosis es uno de los más complejos debido a los diferentes componentes morfológicos y moleculares que involucra (19, 20). La apoptosis es un proceso normal durante el desarrollo de células individuales, tejidos y órganos, y tiene un papel esencial en el control de la proliferación celular y en la respuesta a retos inmunológicos o daños celulares inducidos por enfermedades infecciosas, señales de estrés intracelular y por exposición a agentes externos como toxinas o fármacos. Por lo anterior, la alteración o interrupción de la apoptosis induce el desarrollo de varias alteraciones como enfermedades neurodegenerativas, sepsis, infarto del miocardio, isquemia, diabetes y cáncer. De hecho, muchos agentes anticancerígenos ejercen su función mediante la inducción de la apoptosis (20, 21).

Las características morfológicas de la apoptosis son la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la reducción del volumen celular, la formación de vesículas en la membrana, la modificación ultraestructural de organelos y la pérdida de la integridad de la membrana celular.

También, hay cambios bioquímicos destacables, como la activación de caspasas (proteasas cisteína-aspartato específicas), la degradación de ácidos nucleicos y proteínas, y la alteración de la membrana celular. Básicamente, las caspasas pueden ser iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) o efectoras (caspasas 3, 6 y 7) y actúan sobre cientos de sustratos que participan, por ejemplo, en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, en el ensamblaje de estructuras celulares y en el transporte de membrana. La activación de las caspasas, la cual consiste en un procesamiento autocatalítico, conlleva a la destrucción de la estructura del citoesqueleto, a la alteración de las propiedades de membrana y a la activación de enzimas deletéreas para el ADN.

Además, hay otras proteínas que se han asociado con la apoptosis y son las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales actúan como moduladores anti-apoptóticos al favorecer la supervivencia, o como moduladores pro-apoptóticos al favorecer la muerte celular (20-22).

En las células mamíferas, la apoptosis es mediada por dos vías: una ruta extrínseca de receptor de muerte y una ruta intrínseca mitocondrial. La vía extrínseca es inducida por receptores “de muerte” pertenecientes a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, los cuales inducen la formación de un complejo de señalización inductor de muerte (*Death-Inducing Signalling Complex*, DISC) que favorece el reclutamiento de la caspasa 8 para, finalmente, activar la caspasa 3.

Por su parte, la ruta intrínseca involucra la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, lo cual produce la liberación del citocromo C y la activación de caspasas. Esta vía intrínseca es activada por estímulos como el daño del ADN o lesiones citotóxicas, y actúa mediante la liberación de algunas proteínas de la familia Bcl-2. En condiciones homeostáticas, las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas mantienen la integridad mitocondrial al inhibir la acción de las proteínas Bcl-2 proapoptóticas. Sin embargo, ante un estímulo nocivo, algunas de las proteínas proapoptóticas se liberan al citosol e inducen la formación de un poro en la membrana mitocondrial por el cual se libera el citocromo C.

Finalmente, se produce el reclutamiento y la activación de la procaspasa 9, que junto con el citocromo C y el factor 1 activador de la proteasa de la apoptosis o proteína APAF1 (*Apoptosis Protease Activating Factor 1*), forman un complejo denominado apoptosoma. La activación de la procaspasa 9 favorece la activación de caspasas efectoras como la 3, 6 y 7 (20-24). Como es evidente según lo anterior, ambas vías de señalización apoptótica convergen en la activación de las caspasas efectoras.

Respecto a la fragmentación del ADN que se deriva de la activación de las caspasas, es importante mencionar que este proceso es el sello distintivo o la “marca registrada” de la apoptosis. La primera etapa de esta fragmentación es un clivaje cerca de los nucleosomas, lo que genera fragmentos de ADN entre 50 y 300 kb. La segunda etapa es un corte internucleosómico, lo cual produce fragmentos de menos de 180 pares de bases (pb). Varias nucleasas y otros agentes se han relacionado con la degradación del ADN durante la apoptosis; entre ellos, la endonucleasa G (Endo-G), el factor inductor de la apoptosis (*Apoptosis Inducing Factor*, AIF) y el factor de fragmentación de ADN (*DNA Fragmentation*

Factor, DFF). Cada uno de estos elementos tiene una localización celular distintiva y causa la fragmentación del ADN por vías diferentes. Así, la translocación al núcleo de la Endo-G y del AIF lidera la fragmentación del ADN mediada por la vía intrínseca o mitocondrial, mientras que la activación y translocación nuclear del DFF son mediadas por la activación de las caspasas efectoras, induciendo la degradación característica de ADN oligonucleosómico de bajo peso molecular (25-27). Sin embargo, se ha reportado que la inhibición o la ausencia de algunas caspasas no evitan la fragmentación de ADN, lo que sugiere que este proceso puede ocurrir sin participación de las caspasas (27).

MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN PROTOZOARIOS

Recientemente, se ha encontrado que algunos protozoos, como *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Blastocystis hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*, sufren un tipo de muerte celular programada similar a la apoptosis. En efecto, frente a algunos estímulos nocivos, estos parásitos presentan alteraciones morfológicas que incluyen condensación cromosómica, fragmentación del ADN nuclear, encogimiento celular, pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, formación de cuerpos apoptóticos y exteriorización de la fosfatidilserina (28-30). Aunque esto hace pensar que estos protozoos pueden sufrir apoptosis, la maquinaria celular y las proteínas marcadoras involucradas en este proceso no se han identificado (29,31-39).

Por otro lado, los análisis bioinformáticos sugieren que en *Tetrahymena* sp., *Plasmodium* spp. y *Toxoplasma* sp., existen proteínas proapoptóticas asociadas a la mitocondria (40,41). Asimismo, se ha establecido que en los metazoarios se encuentran algunas proteínas con características similares a las descritas para las caspasas (41-47). Sin embargo, a pesar de todas estas similitudes, se han establecido diferencias clave en los mecanismos moleculares que gobiernan la muerte celular programada en estos organismos. Esto ha generado una controversia sobre si ocurre realmente apoptosis en los protozoarios y, más específicamente, en los protozoarios amitochondriales como *Giardia* spp. (41).

Recientemente, se ha propuesto que en los protozoarios hay un proceso similar a la apoptosis mediado por metacaspasas. De hecho, los estudios filogenéticos plantean la hipótesis de que las metacaspasas son las proteasas ancestrales y que las caspasas divergieron mediante la evolución bajo presión medioambiental (48). Además, hay estudios que demuestran que la levadura *Saccha-*

romyces cerevisiae posee dos tipos de metacaspasas y que uno de ellos está involucrado en la apoptosis (49, 50). Aunque las metacaspasas son proteasas de cisteína con similitud estructural a las caspasas, tienen un bolsillo ácido con afinidad hacia la arginina y la lisina, a diferencia de las caspasas que tienen especificidad por el ácido aspártico. Esto ha llevado a un desacuerdo sobre la clasificación de las metacaspasas como parte de la familia de las caspasas, ya que se dice que la especificidad de estas enzimas debería determinar su clasificación más allá de cualquier similitud estructural (51,52). Estas diferencias entre la especificidad de sustrato entre las metacaspasas y las caspasas, generan dudas sobre el potencial papel de las metacaspasas en la muerte celular programada similar a apoptosis, propuesta en los parásitos protozoarios (48).

En algunos protozoos, unas pocas funciones de las mitocondrias son suplidas por proteínas citoplasmáticas o de organelos como los hidrogenosomas; sin embargo, no se sabe si este organelo puede intervenir en la muerte celular programada similar a la apoptosis. En *T. vaginalis*, un parásito con hidrogenosomas, se ha observado que, al adicionar metronidazol o al retirar nutrientes del medio, hay efectos sobre la morfología y la supervivencia celular, lo que sugiere posibles mecanismos de muerte celular programada similares a la apoptosis (53).

MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN *GIARDIA SPP.*

Como se mencionó anteriormente, bajo ciertas condiciones de cultivo, *T. vaginalis* sufre cambios que sugieren un proceso de muerte celular programada similar a la apoptosis. Un comportamiento similar se ha observado en *G. intestinalis* bajo diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, la aplicación de la quinona natural beta-lapachona o la privación de suero, inducen formación de vesículas en la membrana celular, condensación de la cromatina, contracción celular y vacuolización citoplasmática (54).

Del mismo modo, al someter al parásito a diferentes concentraciones de metronidazol, peróxido de hidrógeno o a crecer en un medio de cultivo deficiente en cisteína y ácido ascórbico, se presentan alteraciones morfológicas similares a las observadas en la apoptosis. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se definen los posibles mecanismos moleculares que pueden intervenir en este proceso, ni se han identificado caspasas u otro tipo de proteasas, lo que sugiere que *G. intestinalis* posee una vía independiente de inducción de muerte celular programada (55).

Existe un estudio en el que, al transfectar en *Giardia spp.* una proteína recombinante de la familia Bcl-2 humana (Bax), se alteró la enquistación y se indujo muerte celular. Esto sugiere que *Giardia spp.* podría tener proteínas sustratos para Bax, entre los que se cuentan posibles proteínas que hacen parte de las vesículas específicas de la enquistación (Encystation-Specific Vesicles, ESV), las cuales conducen a la liberación de proteínas de la pared del quiste y a la muerte celular, aparentemente sin participación de la mitocondria (56).

En un estudio muy reciente en el que se sometieron trofozoítos de *Giardia spp.* a estrés oxidativo usando peróxido de hidrógeno y metronidazol, y a estrés alimenticio dejando las células sin medio de cultivo por un período de hasta 16 horas, se observó muerte celular programada similar a la apoptosis (57). En el citado trabajo se demuestra que hay muerte celular programada por medio de un mecanismo sin participación de las caspasas, ya que no se pudo detectar la actividad de estas enzimas. Sin embargo, el estudio muestra que hay fragmentación del ADN nuclear y que ocurren cambios morfológicos asociados a muerte celular programada. Además, los autores muestran resultados de búsquedas bioinformáticas de genes relacionados con apoptosis, entre ellos caspasas y metacaspasas, también con resultados negativos. Sin embargo, en los ensayos de privación total de medio, estos autores demostraron procesos de tipo autofágico en el parásito. Esta observación fue respaldada por análisis morfológicos y por bioinformática, en los que encontraron proteínas ortólogas a algunas relacionadas con la vía de autofagia presente en eucariotes superiores (57, 58).

En nuestros laboratorios hemos observado fragmentación del ADN de *G. intestinalis* al tratar trofozoítos con metronidazol o al someter los cultivos a la privación de colesterol. Sin embargo, es notable que la fragmentación observada en *G. intestinalis* difiere de la que se observa normalmente en eucariotas superiores (figura 2, línea 7), ya que en el parásito es evidente una acumulación de ADN de tamaños inferiores a 250 pb (figura 2, líneas 3 a 6). Esta acumulación aumenta a través del tiempo, sugiriendo un proceso enzimático en respuesta a los estímulos de estrés impuestos. La fragmentación del ADN de *G. intestinalis* no había sido demostrada anteriormente por electroforesis en geles de agarosa y eso nos permitió, con base en los tamaños de los fragmentos, sugerir que la degradación se da principalmente a nivel intranucleosómico. Además, estamos investigando si ocurre regulación a nivel de mensajero y de proteína de un gen hallado por nosotros mediante

bioinformática, el cual es ortólogo de una endonucleasa que participa en la apoptosis en eucariotes superiores.

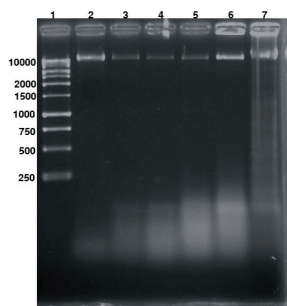


Figura 2. Efecto de la deprivación de colesterol en la fragmentación de ADN de trofozoítos de *Giardia intestinalis*. 1. Marcador de peso de ADN; 2. Control trofozoítos sin tratamiento; 3. 6 horas; 4. 12 horas; 5. 24 horas; 6. 48 horas; 7. Control ADN células MDCK deprivadas de suero por 24 horas.

Aún se desconoce el mecanismo de muerte celular programada en un organismo sin mitocondrias como *Giardia* spp. Las rutas que están involucradas no se han identificado y los resultados que arrojan los diversos estudios publicados hasta ahora no son contundentes. Es posible que, para algunos parásitos como *Giardia*, la muerte celular programada resulte siendo un tipo de muerte altruista, el cual beneficia a las subpoblaciones resistentes capaces de sobrevivir ante condiciones adversas, como la deficiencia de nutrientes o la presencia de un agente tóxico o un fármaco. También, es posible que sea una decisión conjunta que evite la sobrepoblación de parásitos, favoreciendo de ese modo la replicación exitosa de una parte de la población y disminuyendo los daños en el huésped (53,59,60). En conclusión, hasta el momento no se sabe si *Giardia* spp., sufre apoptosis y cuál es su finalidad en una población celular aparentemente independiente.

Finalmente, es importante resaltar que los análisis globales de transcriptoma y proteoma en busca de elementos involucrados en la muerte celular programada de *Giardia* spp., así como el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso, pueden abrir posibilidades terapéuticas que permitan proponer nuevos blancos de acción farmacológica que sean eficaces para la prevención y el control de la giardiasis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad El Bosque, mediante el proyecto PCI 2010-106.

REFERENCIAS

1. Adam R. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14:447-75.
2. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Crit Rev Microbiol. 2002;28:123-47.
3. Juckett G, Trivedi R. Evaluation of chronic diarrhea. Am Fam Physician. 2011;84:1119-26.
4. Lora-Suárez F, Marín-Vásquez C, Loango N, Gallego M, Torres E, González M, et al. Giardiasis in children living in post-earthquake camps from Armenia (Colombia). BMC Public Health. 2002;2:1471-2458.
5. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol. 2010;8:413-22.
6. Carranza P, Lujan H. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. Microbes Infect. 2010;12:71-80.
7. Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int J Parasitol. 2003;33:3-28.
8. Cueto A, Feldman R. Giardiasis. En: Basualdo JA, Coto C, de Torres RA. Microbiología Biomédica. 2ª edición. Buenos Aires (Argentina): Atlante Editorial; 2006.
9. Lujan H, Svärd S. *Giardia*: A model organism. Austria: Springer-Verlag/Wien; 2011.
10. Lujan HD, Mowatt MR, Nash TE. Mechanism of *Giardia lamblia* differentiation into cyts. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61:294-304.
11. Müller N, von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. Int J Parasitol. 2005;35:1339-47.
12. Noemi I, Atías A. Giardiasis. En: Atías A, editor. Parasitología médica. 1ª edición. Santiago de Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo; 1998. 134-41.
13. Tejman-Yarden N, Eckmann L. New approaches to the treatment of giardiasis. Curr Opin Infect Dis. 2011;24:451-6.
14. Raether W, Hänel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol Res. 2003;90(Supp.1):S19-39.

15. Muller M. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery*. 1983;93:165-71.
16. Edwards D. Reduction of nitroimidazoles in vitro and DNA damage. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:53-8.
17. Hoyne GF, Boreham PFL, Parsons PG, Ward C, Biggs B. The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitology*. 1989;99:333-9.
18. Escobedo AA, Cimerman S. Giardiasis: A pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8:1885-902.
19. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*. 2007;14:1237-43.
20. Duprez L, Wirawan E, Vanden T, Vandenaabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infect*. 2009;11:1050-62.
21. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.
22. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:47-59.
23. Renault TT, Manon S. Bax: Addressed to kill. *Biochimie*. 2011;93:1379-91.
24. Krautwald S, Ziegler E, Rölver L, Linkermann A, Keyser KA, Steen P, et al. Effective blockage of both the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in mice by TAT-crmA. *J Biol Chem*. 2010;285:19997-20005.
25. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412:95-9.
26. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/ inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem*. 1999;274:30651-56.
27. Kitazumi I, Tsukahara M. Regulation of DNA fragmentation: The role of caspases and phosphorylation. *FEBS Journal*. 2011;278:427-41.
28. Arambage SC, Grant KM, Pardo I, Ranford-Cartwright L, Hurd H. Malaria ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro. *Parasit Vectors*. 2009;2:32.
29. Duszenko M. Death of a trypanosome: A selfish altruism. *Trends Parasitol*. 2006;22:536-42.
30. Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, et al. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): Implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ*. 1995;2:285-300.
31. Saha C. Apoptosis in *Leishmania* species and its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*. 2006;123:233-44.
32. Nasirudeen AM. Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology*. 2004;150:33-43.
33. Chose O, Noël C, Gerbod D, Brenner C, Viscoigliosi E, Roseto A. A form of cell death with some features resembling apoptosis in the mitochondrial unicellular organism *Trichomonas vaginalis*. *Exp Cell Res*. 2002;276:32-9.
34. Ramos E, García AO, Nequiz M, Saavedra E, Tello E, Saralegui A, et al. *Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. *Exp Parasitol*. 2007;116:257-65.
35. Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P. Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:590-1.
36. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: Apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ*. 2002;9:65-81.
37. Peng BW, Lin J, Lin JY, Jiang MS, Zhang T. Exogenous nitric oxide induces apoptosis in *Toxoplasma gondii* tachyzoites via a calcium signal transduction pathway. *Parasitology*. 2003;126:541-50.
38. Hurd H, Grant KM, Arambage SC. Apoptosis-like death as a feature of malaria infection in mosquitoes. *Parasitology*. 2006;132(Supp.):S33-47.
39. Welburn SC, Macleod E, Figarella K, Duszenko M. Programmed cell death in African trypanosomes. *Parasitology*. 2006;132(Supp.):S7-18.

40. Akematsu T, Endoh H. Role of apoptosis-inducing factor (AIF) in programmed nuclear death during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *BMC Cell Biol.* 2010;11:13.
41. Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasit Vectors.* 2011;4:44.
42. González IJ, Desponds C, Schaff C, Mottran JC, Fasel N. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity *Int J Parasitol.* 2007;37:161-72.
43. Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyan A, Debrajant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell.* 2007;6:1745-57.
44. Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ.* 2008;15:113-22.
45. Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, Monbrinson F, Kaiser K, et al. Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J Infect Dis.* 2007;195:1852-9.
46. Le Chata L, Sindenb RE, Dessensa JT. The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;153:41-7.
47. Kosec G, Álvarez V, Agüero F, Sánchez D, Dolinar M, Turk B, et al. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;145:18-28.
48. Meslin B, Zalila H, Fasel N, Picot S, Bienvenu AL. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasit Vectors.* 2011;4:26.
49. Mazzoni C, Falcone C. Caspase-dependent apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 2008;783:1320-7.
50. Lee RE, Puente LG, Kaern M, Megeney LA. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. *Plos One.* 2008;3:e2956.
51. Vercaemenn D, Declercq W, Vandenaabeele P, van Breusegem F. Are metacaspases caspases? *J Cell Biol.* 2007;179:375-80.
52. Atkinson HJ, Babbit PC, Sajid M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends Parasitol.* 2009;25:573-81.
53. Chose O, Sarde CO, Gerbod D, Viscogliosi E, Roseto A. Programmed cell death in parasitic protozoans that lack mitochondria. *Trends Parasitol.* 2003;19:559-64.
54. Corrêa G, Vilela, R, Menna-Barreto RF, Midlej V, Benchimol, M. Cell death induction in *Giardia lamblia*: Effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitol Int.* 2009;58:424-37.
55. Ghosh A, Ghosh AN, Nosaki T, Ganduly S. Oxidative stress-induced cell cycle blockage and a protease-independent programmed cell death in microaerophilic *Giardia lamblia*. *Drug Des Devel Ther.* 2009;3:103-10.
56. Hehl AB, Regos A, Schraner E, Schneider A. Bax function in the absence of mitochondria in the primitive protozoan *Giardia lamblia*. *Plos One.* 2007;2:e488.
57. Bagchi S, Oniku AE, Topping K, Mamhoud ZN, Paget TA. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology.* 2012;12:1-10.
58. Brennand A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PA. Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol.* 2011;177:83-99.
59. Reece SE, Pollitt LC, Colegrave N, Gardner A. The meaning of death: Evolution and ecology of apoptosis in protozoan parasites. *Plos Pathog.* 2011;7:e1002320.
60. Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Volker T. Protozoan parasites: Programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol.* 2007;23:376-83.

CONFLICTO DE INTERÉS: los autores no registran conflictos de interés en este artículo.

Universidad EL BOSQUE LO QUE BUSCAS

MAESTRÍA SALUD PÚBLICA

Título Obtenido: Magíster en Salud Pública
Duración: Cuatro semestres
Modalidad: Presencial

Requisitos

- Profesionales con distintas miradas y sentidos de lo público, de lo comunitario, de lo político, de lo social y de lo económico.
- Demostrar interés en completar su formación académica con altos estándares de calidad y profundidad En el conocimiento, para poder enfrentar y ofrecer respuestas efectivas a las problemáticas de la salud y la calidad de vida del país.

Dirigido a

Profesionales de la salud, de la ingeniería, de la administración, de la sociología, la antropología, la psicología y del derecho.

Metodología

El Programa se desarrolla en modalidad presencial semanal, viernes de 2:00 pm. a 9:00 pm. y sábados de 8:00 am. a 2:00 pm.



www.uelbosque.edu.co

Facultad de Medicina. Carrera 7 B Bis No. 132 - II. PBX: 6489000 Extensión: 1226.
Atención al Usuario: 6489000 Extensión: 1170. Línea Gratuita: 018000113033

Reg snies 91369. Institución de Educación Superior sujeta a inspección y vigilancia por el Ministerio de Educación Nacional.

 UNIVERSIDAD
EL BOSQUE

Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido