

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

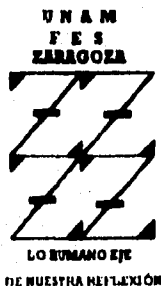
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

15  
21

POLIMORFISMO GENETICO DE G. lamblia  
DETERMINADO POR EL USO DE ENZIMAS  
DE RESTRICCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
LETICIA ELIGIO GARCIA



MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Investigación en  
Parasitología del Hospital Infantil de México, "Federico Gómez",  
bajo la dirección de la Dra. Enedina Jimenez Cardoso**

## **Dedico este trabajo:**

**a mis padres: Juana García Yanquis y Rey Eligio C.**

como una pequeña retribución de la enorme deuda que he contraído con ellos desde el día en que nací y porque con su ejemplo me han enseñado a enfrentar con valentía cualquier obstáculo en esta vida de lucha y superación constante

**a mis hermanos: Carlos, Miguel Ángel, Ricardo y Juan Manuel.**

Por todos los momentos compartidos, y por formar un equipo muy especial en las buenas y en las malas.

**a mi familia materna, por todo lo que me han dado.**

**a mi esposo : J. Antonio Peña A.**

Por su apoyo incondicional, su amor y su comprensión.

**a mi hija Gaby.**

quien con su presencia ha llenado mi vida de satisfacción, dicha y amor, convirtiéndose en el motor que impulsa mi vida.

con amor: *Lelly\**

## **Gracias**

**Dra. Enedina Jiménez Cardoso**

Por permitirme llevar a cabo este trabajo en su laboratorio, y por su apoyo en todo momento, así como por contribuir de manera importante en mi formación profesional, compartiendo conmigo generosa y desinteresadamente su experiencia y conocimientos.

**Q.F.B. Roberto C. González Meléndez.**

Por su esmerada asesoría para la presentación de este trabajo. Por su confianza, paciencia y ética profesional.

**a los integrantes del jurado:**

**Q.B.P. Gustavo Miranda Contreras.**

**Dra. Martha Legorreta Herrera.**

**Q.F.B. Francisco Javier Parada García.**

Por sus valiosas observaciones, que han contribuido de manera importante en la mejoría de este trabajo.

al personal del Laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México "FG", especialmente a **Pily, Mabel, Vis y Vicky** por su amistad y apoyo en todo momento.

**a mis maestros:**

**Prof. Eduardo José Ojeda Sosa.  
Quim. Jorge Rivas Montes.  
Q.F.B. Carlos M. Villalpando R.  
Biol. Roberto King Díaz.  
I.B.Q. Víctor Corvera pillado.  
Q.F.B. Juan Pedro Antonio.  
Q.F.B. Antonino saenz Prieto.**

**Que durante toda mi vida estudiantil han contribuido de manera importante a mi desarrollo intelectual, y por su gran compromiso académico, que los hace capaces de ofrecer un conocimiento, un consejo o una palabra de aliento a quien se lo solicita.**

**a mis amigos de toda la vida, por los momentos compartidos**

**. Adriana, Fidelfa, Ana Laura, Edgar, Lucy, Andrés, Martha, Norma. Bema, Miriam, Ugalde, Daniel, Emma , Chucho, Eliseo, Luisito, Celia, Alf, Tony, Magda...**

**Con cariño: *Lelly\****

## ÍNDICE

|                                    | página |
|------------------------------------|--------|
| • Resumen .....                    | 1      |
| • Introducción .....               | 2      |
| • Planteamiento del problema ..... | 22     |
| • Hipótesis y objetivo .....       | 23     |
| • Diseño de investigación .....    | 24     |
| • Material .....                   | 26     |
| • Métodos .....                    | 28     |
| • Diagrama de flujo .....          | 32     |
| • Resultados .....                 | 36     |
| • Discusión .....                  | 47     |
| • Conclusiones .....               | 50     |
| • Bibliografía .....               | 51     |
| • Apéndice .....                   | 59     |
| • Glosario .....                   | 61     |

## RESUMEN

La giardiasis es una enfermedad parasitaria provocada por el protozoo entérico flagelado *Giardia lamblia*. Esta infección de distribución cosmopolita afecta principalmente a niños en edad escolar, los cuales presentan manifestaciones clínicas muy variables, que van desde infecciones asintomáticas, cuadros diarreicos leves y/o esporádicos hasta diarreas crónicas con sintomatología extensa, otras manifestaciones importantes, y el síndrome de malabsorción muy severo. Este comportamiento heterogéneo frente al huésped puede atribuirse a la compleja relación huésped-parásito, determinado en gran medida por factores genéticos inherentes al parásito. El gen *tsp11*, el cual se encuentra de forma muy conservada en el genoma de *Giardia lamblia*, codifica para una proteína de superficie rica en cisteína, con segmentos repetitivos de Cys-X-X-Cys, y se ha supuesto su participación en los mecanismos de adherencia. Por ello, se propuso determinar la variación genética de *Giardia lamblia* mediante los patrones de restricción del gen *tsp11* y para ello se obtuvo DNA de quistes de *Giardia lamblia* a partir de materia fecal y se realizó una amplificación del segmento de 520pb correspondiente al gen *tsp11*, el cual posteriormente se cortó con enzimas de restricción. Los resultados mostraron diferencias importantes entre los patrones de restricción de las 30 muestras estudiadas, lo cual permitió clasificarlas en 4 grupos. Estos resultados indican que el gen *tsp11* presenta un polimorfismo genético, lo cual podría estar relacionado con los diferentes niveles de patogenicidad que presenta el huésped frente a *Giardia*.



## INTRODUCCIÓN

### ANTECEDENTES

*Giardia lamblia* fue el primer parásito microscópico observado en la especie humana. Fue descubierto por Leewoehoeck,<sup>1</sup> al parecer cuando observaba una muestra de materia fecal en el microscopio y la describió en una carta a la secretaria de The Royal society en 1681. Después de este hallazgo se originó una controversia acerca de la nomenclatura de este parásito. En 1859 Lambl<sup>2</sup> realizó la primera descripción identificable y le dio el nombre de *Cercomonas intestinalis*. Subsecuentemente durante el siglo XIX diversos autores la clasificaron dando una larga lista de nombres a *Giardia* aislada de animales y humanos. En 1882 Kunster<sup>3</sup> creó el nombre genérico de *Giardia* para designar protozoos flagelados aislados de intestino de batracios. posteriormente se observó que el protozoo de batracios y el aislado de intestino humano era del mismo género. En 1888 Blanchard<sup>4</sup> sugirió que el parásito fuera denominado *lamblia* para honrar al profesor Lambl. Finalmente Stiles en 1915<sup>5</sup> creó una denominación binomial nueva, que hasta ahora se utiliza; *Giardia lamblia* en honor al profesor Alfred Giard de Paris, Francia y del profesor Vilem Lambl de Praga, Checoslovaquia. En la actualidad se usan como sinónimos para nombrar a *Giardia* otras nomenclaturas, como *Giardia duodenalis* y *Giardia intestinalis*.

## TAXONOMÍA y CLASIFICACIÓN

Al igual que ocurre con todos los organismos, la clasificación de *Giardia* cambia continuamente, no obstante la clasificación que se considera en la actualidad es la siguiente<sup>6</sup>:

Phillum: ***Sarcomastigophora*** (organismos de una sola célula).

Subphillum: ***Mastigophora*** (flagelos como órganos de locomoción)

Orden: ***Diplomonadida***

Suborden: ***Diplomonadina***

Clase: ***Zoomastigophorea***.

Familia: ***Hexamitidae***

Género: ***Giardia***

Especie: ***lamblia***

Las especies de *Giardia* han sido clasificadas por dos características principales, huéspedes de origen (organismo del que son aislados) y morfología del cuerpo medio dada por microscopía de luz<sup>7</sup>. En la figura 1 se muestran los tipos de morfología de *Giardia*, observados en tres especies: ***G.agilis*** para los anfibios, ***G.muris*** de ratones y ***G.lamblia*** de humanos. También se han observado diferencias no morfológicas muy marcadas, como son la medida y el aparente número de cromosomas entre las tres especies.<sup>8</sup>

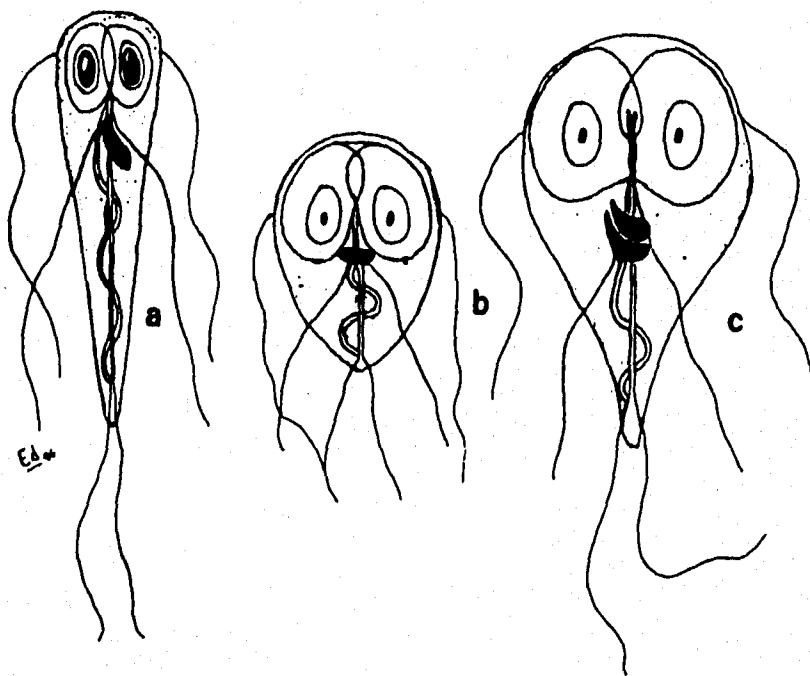


Figura 1: Diagrama representativo de tres tipos morfológicos de Giardia (A) *G. agilis*, (B) *G. muris* y (C) *G. lamblia*.

(Nohýnková, 1992).

## MORFOLOGÍA

*G. Jambli* es un protozoo flagelado que presenta una fase infectante (quiste), y una parasitaria, que es la entidad responsable de la patogenicidad (trofozoito). Como trofozoito presenta una forma piriforme, de perfil más delgado que de frente, con un tamaño variable, que va de 9-20  $\mu$  de longitud por 5-12 de ancho. A diferencia de otros protozoarios no presenta membrana ondulante, está constituido por un citoesqueleto consistente en un cuerpo anterior, un cuerpo medio, una cara dorsal convexa y una ventral plana, esta última ocupada por dos depresiones adyacentes que constituyen el disco succionador, una estructura cóncava que ocupa más de la tercera parte de la superficie ventral del trofozoito, y que actúa como ventosa para adherirse a la mucosa intestinal.<sup>9-10</sup> Tiene cuatro pares de blefaroplastos que dan origen a los cuatro pares de flagelos (anterior, caudal, posterior y ventral), los cuales actúan como órganos de locomoción, también se observan nueve pares de microtúbulos simétricamente colocados alrededor de la parte exterior de cada flagelo, con dos microtúbulos en la mitad.<sup>11</sup> Se ha reportado un aparato de Golgi<sup>12</sup> que ha sido observado en quistes solamente, también se han reportado otros distintos organelos, como vacuolas lisosomiales, las que contienen una gran cantidad de hidrolasas, entre las que se incluyen; fosfatasas, DNAasas y RNA asas,<sup>13-14</sup> presenta dos núcleos idénticos dispuestos a los lados de la línea media, estos presentan una estructura ovoide y contienen un cariosoma central formado por una masa densa de cromatina la cual está dispersa en el nucleoplasma, la membrana nuclear está parcialmente cubierta por ribosomas, que aparecen como pequeños cuerpos ricos en RNA.<sup>15</sup>

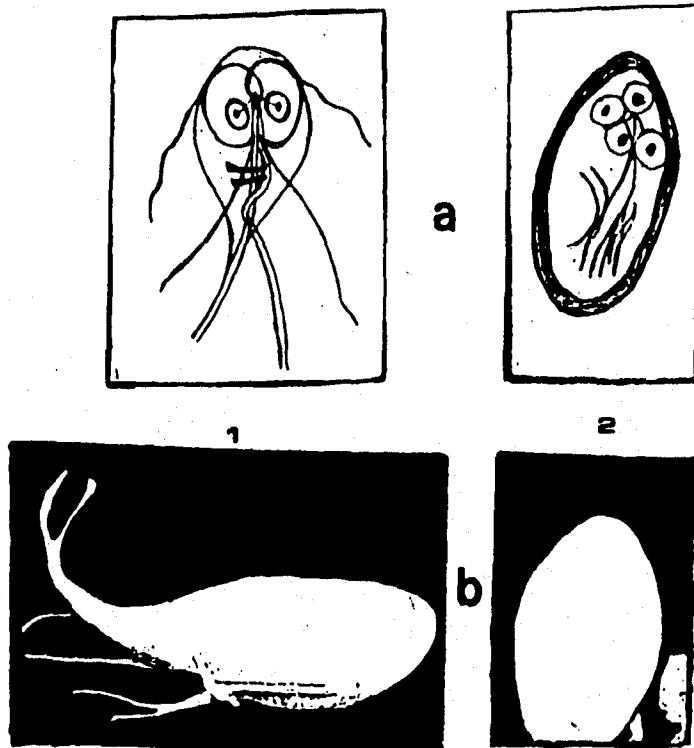


Figura 2: Morfología del trofozoito (1) y el quista (2) de *G. lamblia*. A) Modelo esquemático y B) Microscopía electrónica de barrido ( Brock, D. *Biology of microorganisms*. 1969)

Durante el movimiento el parásito tiende a enroscarse sobre si mismo imitando lo que se conoce como "hoja que cae". y gracias a los rápidos movimientos de sus flagelos, el trofozoito de *Giardia* se desplaza activamente de un lugar a otro para aplicar su disco suctor a la superficie epitelial, además los flagelos ventrales crean un sistema de válvulas hidrodinámicas que favorecen la adhesión; en base a algunos trabajos se ha supuesto la participación de las lectinas de superficie con especificidad para residuos D-glucosil de la superficie del enterocito, los que podrían actuar como receptores.<sup>18</sup>

Se reproduce asexualmente mediante un complicado proceso de fisión binaria (figura 3), el cual se puede llevar a cabo en ambos estadios; como quiste y como trofozoito, durante este proceso se lleva a cabo la división del

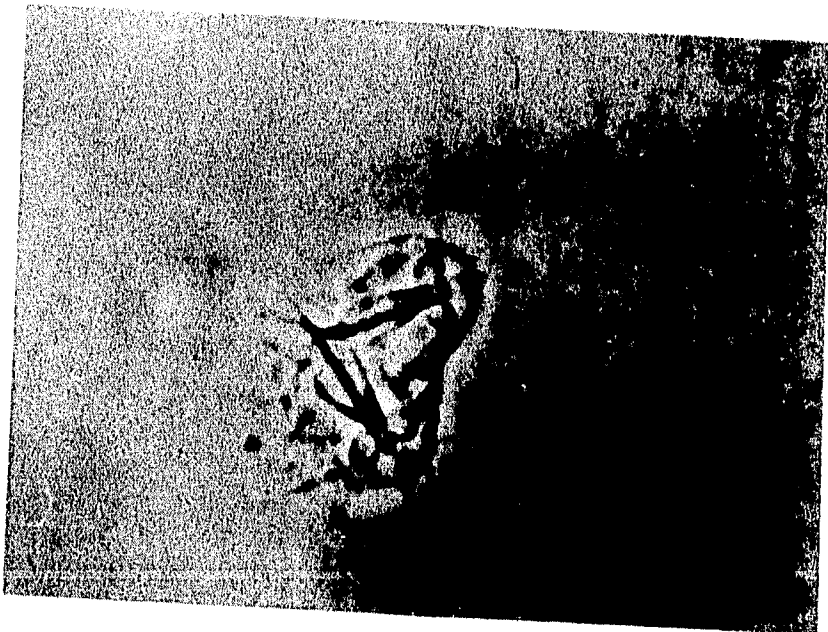


Figura 3.- Reproducción de *G.lambli*a mediante fisión binaria (Lab de Inv en Parasitol. Hospital Infantil de México.)

Los quistes son ovoides, miden aproximadamente 5 x 8  $\mu$ , tienen una pared gruesa constituida por carbohidratos, principalmente galactosamina y glucosa, además de proteínas de membrana, contienen cuatro núcleos pequeños los maduros, y los recién formados sólo dos.<sup>17-18</sup> En general el citoplasma está encogido, separado de la pared del quiste dejando un espacio entre los dos, y así permanece hasta que es ingerido y desenquistado en el intestino del nuevo huésped, en pruebas realizadas "in vitro" se ha logrado inducir el desenquistamiento en medio Fosfato-bicarbonato,<sup>19</sup> y esto ha servido para conocer más acerca de su estructura. El quiste es relativamente resistente a las condiciones del medio ambiente y a los ácidos gástricos del estómago del paciente, así como a soluciones cloradas y desinfectantes comunes, sin embargo se destruye fácilmente a temperaturas superiores a 50°C.

## EPIDEMIOLOGÍA

*Giardia lamblia* es el parásito intestinal más frecuentemente aislado de humanos y animales a nivel mundial y tiene especial prevalencia en niños en edad pediátrica de ciudades en vías de desarrollo.<sup>20-21</sup> Es un parásito cosmopolita pero con cifras de frecuencia muy variables dependiendo de las condiciones sanitarias de cada región y del nivel educativo de la gente.<sup>22-23</sup> Los reportes de trabajos hechos en México en los últimos diez años refieren que hay una variación dependiente de la región entre el 4.9%<sup>24</sup> y el 70%<sup>25</sup> de incidencia, se puede presentar desde la lactancia pero es más común en edades preescolar y escolar, sobre todo en niños pertenecientes a familias numerosas, orfanatos, asilos y guarderías.<sup>26-27</sup> La infección es más frecuente en climas templados y cálidos que en fríos y presenta un

comportamiento característico de alto porcentaje de frecuencia durante la niñez y hasta la pubertad, seguido en los años posteriores por una rápida disminución del mismo, hasta mantenerse estable en la edad adulta, debido principalmente a complicaciones, infecciones recurrentes o reinfecciones.<sup>28</sup>

Se ha demostrado cierta interferencia con el crecimiento y el aprendizaje en aproximadamente el 45% de los pacientes infectados.

La distribución por edad de los niños con giardiasis muestra 21.4% en lactantes, 41.7% en preescolares, 27.9% en escolares y 9% en los adolescentes, estos datos se muestran en la figura 4.<sup>29</sup>

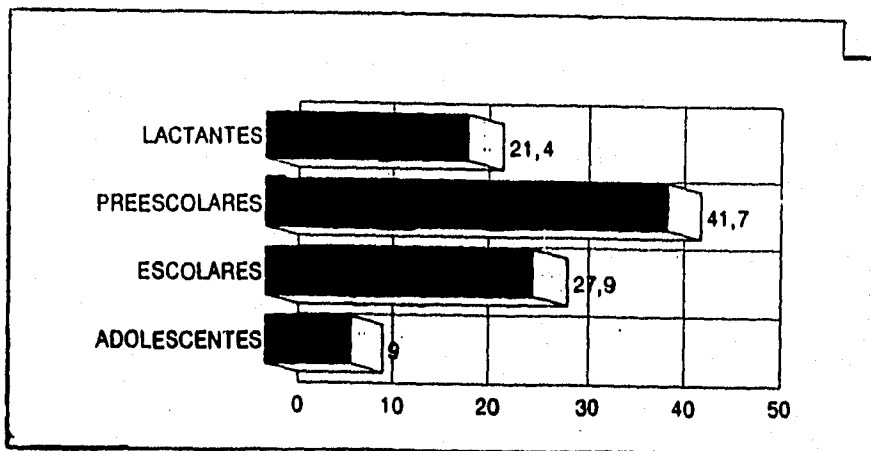


figura 4 : Frecuencia de giardiasis en niños y adolescentes (Bernal, R.R. INDRE 1995)



## MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

En la figura 5 se ilustra de manera esquemática el ciclo biológico de *G.lambli*a. La giardiasis es fácilmente transmisible por fecalismo. se adquiere por la ingestión de hasta diez quistes viables eliminados en las heces de personas infectadas (1), los cuales pueden ser ingeridos de diversas maneras. Según los estudios de brotes epidémicos, se ha demostrado que el agua juega un papel importante en el mecanismo de transmisión<sup>30</sup>, ya que, los quistes pueden localizarse en ríos, pozos y canales de riego, pero cualquier alimento, fomites y moscas domésticas pueden servir de vehículo. Otro mecanismo usual es el contacto íntimo de individuos homosexuales masculinos infectados con no infectados,<sup>31</sup> y en general cualquier mecanismo en el cual se ingieran de una u otra forma los quistes, el quiste posteriormente pasa por el estómago, en donde gracias al pH ácido (2) se inician los procesos bioquímicos que dan lugar al desenquistamiento en la luz intestinal (3), en donde se lleva a cabo la replicación por fisión binaria (4). Después las dos células hijas permanecen en el intestino adheridas a la mucosa (7) o son evacuadas en las heces líquidas (5), cuando la materia fecal comienza a deshidratarse gradualmente en su tránsito hacia el colon se lleva a cabo el proceso de enquistamiento (8).<sup>32-33</sup>

Eventualmente se ha descrito invasión extraintestinal (6), sin embargo, estos casos son muy raros y la mayoría de ellos están asociados a patologías del intestino. Los quistes que van en la materia fecal depositada al aire libre (9), contaminan agua y alimentos de consumo humano (10), iniciando nuevamente el ciclo.

La mejor medida para prevenir la giardiasis es la implementación de medidas sanitarias eficaces que incluyen evitar: el fecalismo, el hacinamiento y la contaminación de agua y alimentos.<sup>34</sup>

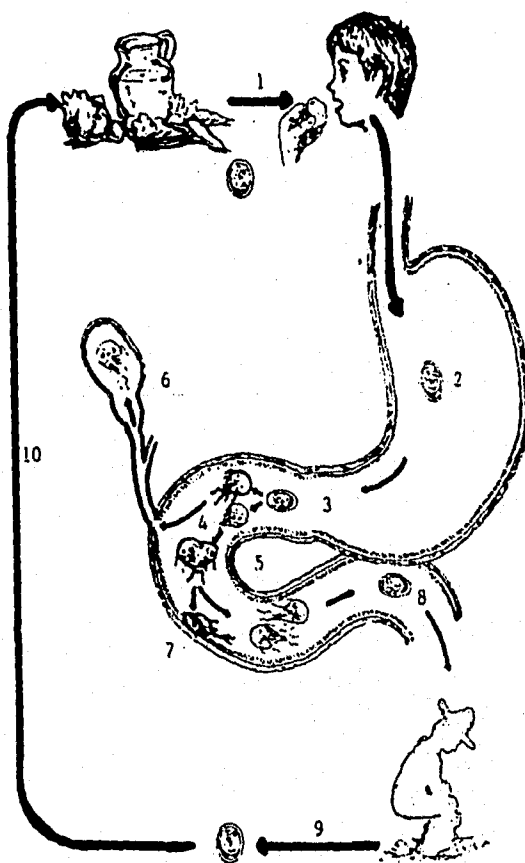


figura 5: ciclo biológico de *G.lamblia*

## PATOGENICIDAD Y CUADRO CLÍNICO

La giardiasis presenta manifestaciones clínicas muy variables, que va desde cuadros asintomáticos, diarreas eventuales con pocas evacuaciones al día sin otras manifestaciones importantes, hasta cuadros de diarrea crónica con el síndrome de malabsorción muy severo y sintomatología extensa.<sup>35</sup> Los trofozoítos adosados a la mucosa intestinal actúan como barrera para la absorción de glucosa, grasa, proteínas, ácido fólico, vitaminas y lactosa, debido a que como se ha observado histopatológicamente en biopsias de pacientes, provoca un acortamiento y engrosamiento de las vellosidades intestinales, interfiriendo con la asimilación de nutrientes. También se ha observado hiperplasia de la lámina propia e inflamación aguda de las mucosas.<sup>36</sup> Después de administrar tratamiento, la arquitectura de las vellosidades puede regresar a la normalidad y resolverse el problema de malabsorción.<sup>37</sup> Otros factores de patogenicidad de *Giardia lamblia* son: la competencia que establece con el huésped por los nutrientes, así mismo, al habitar duodeno y yeyuno en el intestino delgado favorece la colonización bacteriana de estos.<sup>38</sup>

Las manifestaciones extraintestinales se han reportado raramente, y cuando esto ocurre incluye: urticaria,<sup>39</sup> artritis reactiva<sup>40</sup> y retinitis,<sup>41</sup> sin embargo estas complicaciones se deben a la respuesta inmune del huésped ante la infección y no directamente al parásito.

## RESPUESTA INMUNOLÓGICA

Una evaluación de la respuesta inmune del huésped frente a *Giardia* considera el largo tiempo de la infección y el desarrollo aparente de una parcial resistencia a reinfecciones.<sup>42</sup> Algunos trabajos realizados en México, sugieren la participación de proteínas de superficie involucradas en la adherencia, las que desencadenan una respuesta inmunológica de protección en el huésped<sup>43</sup>. La importancia de la respuesta humoral fue sugerida inicialmente por el hecho de que se presentaba una infección sintomática, larga y severa en pacientes con hipogammaglobulinemia.<sup>44</sup> Estudios de la respuesta inmune específica de *Giardia* en humanos infectados voluntariamente mostraron niveles séricos de IgM en el 100%, IgG en el 70% e IgA en el 60%, así como IgA intestinal en el 50% de los pacientes.<sup>45</sup>

Se ha observado una gran proliferación de linfocitos en ratones infectados con *Giardia*<sup>46-47</sup> lo que sugiere que las células T juegan un papel importante en la eliminación de la infección, siendo las células CD4 las más importantes, así mismo, una recrudescencia de la infección ha sido observada en gerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *G.lambli*a después de un tratamiento con corticoesteroides para suprimir la respuesta inmune,<sup>43</sup> lo que indica que la inmunosupresión es un factor importante que también interviene en la severidad de la infección. Existen estudios que indican que los macrófagos pueden jugar también un papel importante en la respuesta inmune a la infección por *G.lambli*a,<sup>49</sup> ya sea actuando como células efectoras que inhiben la multiplicación o destruyéndolos sobre todo en las fases precoces de la infección. Se ha observado que los neutrófilos atacan a los trofozoitos de *G.lambli*a<sup>50</sup> pero en giardiasis no ocurren

infiltrados polimorfonucleares, por lo tanto no hay evidencia de que los neutrófilos sean de importancia en la eliminación de la infección.

Sin embargo *Giardia* y en general los protozoarios presentan algunos mecanismos de evasión frente al sistema inmunológico del huésped, entre ellos los mas comunes son:

El secuestro anatómico; Evaden la respuesta inmunológica desarrollando quistes o habitando en la luz intestinal, donde las células del sistema inmunológico no tienen un fácil acceso, por lo que el parásito esta protegido de los sistemas efectores del sistema inmunitario celular. .

Variación antigénica; Consiste en la variación continua de los principales antígenos de superficie, es decir, en el momento en que el sistema inmunitario ha respondido a la infección, el parásito expresa nuevos antígenos y no vuelve a ser mas un objetivo a eliminar para el sistema inmunitario.

## DIAGNOSTICO

El análisis coproparasitoscópico de Faust en serie de tres es, en general, la primera prueba diagnóstica desarrollada en pacientes con sospecha de giardiasis.<sup>51</sup> Esta técnica consiste en la observación por microscopía de luz de los quistes obtenidos por flotación a partir de muestras fecales recolectadas en tres días consecutivos y la probabilidad de observar los quistes es aproximadamente entre el 50-70% dependiendo en gran medida de la habilidad del investigador clínico, y debido a que la eliminación de quistes es intermitente, se dan con frecuencia falsos negativos.<sup>52</sup>

Los quistes pueden también ser detectados por inmunofluorescencia.<sup>53</sup> y por fluoroscopia se descubre a veces hipermotilidad del duodeno y el yeyuno,

así también los análisis radiográficos revelan en algunos casos defectos en la mucosa.

La detección de antígenos de *Giardia* por contraelectroforesis<sup>54</sup> y ELISA<sup>55</sup> (enzyme linked immune sorbent assay) usando anticuerpos contra trofozoítos, es reportada como más sensible y sencilla, pero no es costeable realizarlas rutinariamente, excepto para laboratorios de investigación.

Recientemente se ha implementado la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa como prueba de diagnóstico para *G.lambli*, la cual es más específica, sensible y sencilla,<sup>56</sup> por lo que podría representar una alternativa viable para el futuro del diagnóstico de *Giardia lambli*, sobre todo para el seguimiento de la infección, y para facilitar el desarrollo de la terapia específica, sobre este tema se abunda más adelante en otro apartado.

## TRATAMIENTO

Existe una gran lista de agentes antiparasitarios efectivos en el tratamiento de la giardiasis, que incluye Quinacrina, Metronidazol, Nitroimidazoles y Furazolidonas,<sup>57</sup> Estos agentes generalmente no actúan sobre el quiste, si no directamente sobre el trofozoito.<sup>58</sup> El tratamiento de humanos asintomáticos siempre ha sido controversial y la decisión se toma con base en las ventajas de salud pública, ya que los portadores pueden contagiar a otras personas con las que conviven cotidianamente.<sup>59</sup> Para eliminar la infección en una familia es necesario dar tratamiento a todos sus miembros simultáneamente y principalmente a los niños.

## GENÉTICA

El estudio de *Giardia* mediante los análisis genéticos clásicos es muy importante y puede ser de gran ayuda para entender su biología. El contenido de G + C, del genoma de este parásito ha sido calculado en aproximadamente el 42% , pero el contenido de C + G del DNA ribosomal ha sido calculado en el 75%.<sup>60</sup>

Poco se sabe acerca de la información genética de los dos núcleos morfológicamente equivalentes de *Giardia lamblia*,<sup>61</sup> los cuales contienen en su estructura cantidades idénticas de DNA y presentan una sincronía en su replicación, además ambos presentan cantidades equivalentes de RNA transcripcionalmente activo.<sup>62</sup> El número de cromosomas por núcleo ha sido estimado en cuatro por microscopía de luz del núcleo teñido con Fluorescencia (DAPI), sin embargo, algunos autores reportan la existencia de cinco o seis cromosomas.<sup>63</sup>

Aún son necesarios muchos estudios para aclarar la controversia de la ploidía de *Giardia*. Algunas observaciones han demostrado que cada trofozoito contiene aproximadamente 30-50 moléculas de DNA cromosomal,<sup>64</sup> una posible explicación es que los trofozoitos de *Giardia* son poliploides y contienen varias copias de cada cromosoma por núcleo. La ploidía de este organismo aún no ha sido determinada, pero se han observado algunos patrones electroforéticos coincidentes con diploidía para un número determinado de enzimas,<sup>65</sup> dando un total de cuatro cromosomas, si cada núcleo tiene un sólo cromosoma y 8 si cada núcleo tiene diferentes cromosomas. El RNA de *Giardia lamblia* es muy peculiar, ya que , es más pequeño que en otros eucariontes y que el de las Eubacterias, por ello se ha clasificado a *Giardia* como el más primitivo eucariote.<sup>66</sup>

El DNA ribosomal contiene solamente 5566pb y es tandemamente repetitivo en el genoma<sup>67</sup> los tandomeros codifican para la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (16S) y formas de 85s, cada una de las cuales es más pequeña que su contraparte en otros organismos eucarióticos.<sup>68</sup>

Poco se conoce acerca del mecanismo de traducción de *Giardia*, pero existen evidencias que demuestran que la iniciación puede ser diferente a la que se lleva a cabo en los eucariotes superiores. De la secuencia para cDNA clonado obtenida y confirmada por la secuenciación de RNA, se ha descubierto una región no traducida muy corta, de no más de 6 nucleótidos,<sup>69</sup> en contraste solo 4/699 mRNA de vertebrados ha mostrado secuencias de menos de 10 nucleótidos de largo, ya que en estos organismos los mRNA con secuencias cortas son generalmente traducidos ineficientemente. El mecanismo propuesto para la iniciación de la traducción eucariótica es el modelo scanning<sup>70</sup>; El nucleótido 5' terminal de mRNA tiene una estructura de capuchón metilado, el cual tiene una función estabilizante. La subunidad pequeña RNA se une al capuchón y se mueve a lo largo del mRNA hasta reconocer el sitio de iniciación marcado por el codón AUG, donde se inicia la traducción. El sitio de reconocimiento (secuencia Shine- Dalgarno) UAAGGAGG localizada 5 o 10 nucleótidos antes del codón de iniciación, ha sido observada en algunas secuencias de *Giardia*, sin embargo en estos casos no existe relación entre la localización de esta secuencia y la de la iniciación del codón.

La transcripción es muy similar a la de otros eucariotes. Se ha identificado una posible caja TATAA en las clonas genómicas que han sido secuenciadas,<sup>71</sup> sin embargo se desconoce si alguna de estas secuencias presenta afinidad por la RNA polimerasa.



Al clonar algunas líneas celulares de diversos aislados de *G.lambli*a se ha observado con gran frecuencia que continuamente aparecen variantes antigénicos.<sup>72</sup> Algunos genes que han sido clonados codifican para polipéptidos ricos en cisteína y son expresados como antígenos de superficie en trofozoítos.<sup>73</sup>

Peter L. Ey y colaboradores han reportado la caracterización de un gen, al cual han denominado Tsp11, este gen es altamente conservado entre cepas de *Giardia* aisladas de lugares geográficos muy lejanos y presenta una secuencia consenso en los extremos terminales, asimismo en algunas cepas se ha observado un gen con características similares, que presenta esta secuencia consenso pero que no esta presente en todas las cepas aisladas<sup>74</sup>.

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa, llamada PCR por sus siglas en inglés, es un procedimiento bioquímico "in vitro", mediante el cual las cadenas individuales del DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de las cuales, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima lograndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento del DNA específico, el cual es determinado por un par de oligos sintéticos, correspondientes a las regiones terminales de la secuencia que se desea amplificar.<sup>75</sup>

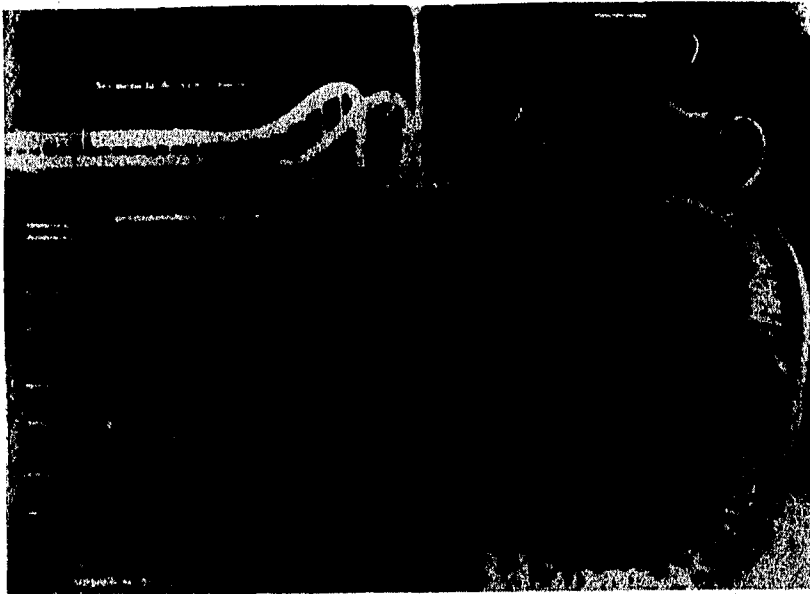


Figura 6: Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR consta de varios ciclos y cada ciclo a su vez esta constituido por tres pasos, los cuales están determinados por temperaturas y tiempos específicos<sup>76</sup> del mismo modo. como se muestra en la figura 5.

a) Desnaturalización: (92-98 °C durante 30-90 seg), en este paso se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.

b) Alineamiento: ( 50-60 °C, 30 a 60 seg), Aquí se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores o iniciadores y las cadenas sencillas del ADN blanco desnaturalizado.

c) Extensión: ( 70-74 °C, 30-90 seg), Por ultimo la polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados, utilizando los desoxinucleótidos libres, formando así las nuevas cadenas.

## ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción también llamadas endonucleasas de restricción son herramientas muy útiles en bioquímica, reconocen secuencias específicas en el DNA de doble cadena y cortan ambas hebras en lugares concretos . Fueron descubiertas por Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans<sup>77</sup>. Se han encontrado enzimas de restricción en una gran variedad de procariontes y su función biológica consiste en reconocer y destruir moléculas de DNA extraño, mientras que el DNA propio de la célula no se degrada debido a que los centros que reconocen sus propias enzimas de restricción están metilados. Muchas de estas nucleasas reconocen secuencias específicas de entre cuatro y ocho pares de bases e hidrolizan un enlace fosfodiéster en cada hebra de esta región, una característica notable de estas secuencias son palindrómicas y los puntos de corte están dispuestos simétricamente. Las enzimas se nombran con una abreviatura de

tres letras que se refiere al organismo hospedador. La eficacia de las enzimas se determina por digestión del DNA del fago  $\lambda$ , y mediante un gel de electroforesis de agarosa se determina el patrón de restricción, el cual ha sido ampliamente reportado en la literatura. En la siguiente tabla se muestran en resumen las propiedades de algunas enzimas de interés para este estudio<sup>78</sup>.

**ENZIMAS DE RESTRICCIÓN  
PROPIEDADES**

| ENZIMA   | HUÉSPED DE ORIGEN                 | SITIO DE CORTE |
|----------|-----------------------------------|----------------|
| Bam HI   | <u>Bacillus amyloliquefaciens</u> | G/GATC         |
| Eco RI   | <u>E.coli</u> RY13                | G/AATCC        |
| Pst I    | <u>H.influenzae</u> Rd            | A/AGCTT        |
| Hind III | <u>P. stuartii</u>                | CTGCA/G        |

**Figura 7: Propiedades de algunas enzimas de restricción. (Clontech catalogues 1992-93. Uniparts S.A. división laboratorios.)**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

*Giardia* presenta en su estructura dos núcleos morfológicamente equivalentes que contienen cantidades similares de DNA, ambos se dividen sincrónicamente y contienen RNArribosomal transcripcionalmente activo.<sup>74</sup> Una gran variedad de genes que codifican para polipéptidos de superficie han sido identificados y clonados en diversos aislados axénicos de *G.lambli*a, estos genes presentan secuencias consenso en los extremos terminales del fragmento codificante. Los polipéptidos predichos para estos genes se caracterizan por la presencia de múltiples copias de cuatro aminoácidos (C-X-X-C).<sup>79,80</sup>

En el presente trabajo se plantea la digestión con endonucleasas de restricción para el gen *tsp11*<sup>81</sup>, el cual es muy conservado en el genoma de *Giardia*, esto con el fin de determinar mediante los patrones de restricción obtenidos las diferencias genéticas entre cepas de la misma especie<sup>82</sup>.

Los diferentes niveles de virulencia y sintomatología que produce *Giardia lambli*a sugieren que presenta una plasticidad genética de cepa a cepa debido, a un gran polimorfismo, ya que tiene un genoma con unidades de repetición susceptibles de cambiar, por esta razón es importante determinar las características de cada cepa y diferenciarlas de acuerdo a su variabilidad genética. Se ha elegido el gen *tsp11*, por estar altamente conservado entre especies de *G.lambli*a, además de que la proteína codificada por este gen presenta características muy interesantes que podrían estar relacionadas con la capacidad de adherencia del trofozoito a la mucosa intestinal.

## **HIPÓTESIS**

Al digerir con enzimas de restricción el segmento correspondiente al gen *tsp11* de *Giardia lamblia* en diferentes aislados, será posible mediante el patrón de restricción diferenciarlas genéticamente y evidenciar así su polimorfismo.

## **OBJETIVO**

Determinar la variación genética de *G.lamblia* mediante los patrones de restricción del gen *tsp11* obtenido por amplificación a partir del genoma total de quistes presentes en heces fecales, utilizando las enzimas Bam HI, Eco RI, Pst 1 y Hind III.

## DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### POBLACIÓN

Se utilizaron 30 Muestras de materia fecal de niños en edad preescolar y escolar (4-10años), positivas a *Giardia lamblia* por el método coproparasitoscópico de Faust.

### TIPO DE ESTUDIO

Experimental.

Prospectivo.

Transversal

Descriptivo

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se trabajó con 30 muestras fecales de niños entre 4-10 años de edad (preescolar y escolar). De sexo indistinto que asistieron al laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de México. Las muestras fecales resultaron positivas a *Giardia lamblia* por el método coproparasitoscópico de Faust.

## VARIABLES

| VARIABLE                                | DEFINICIÓN   | MEDICIÓN   |
|---|--|--|
| Número y tamaño de fragmentos digeridos | El número de fragmentos obtenidos de la digestión, de acuerdo a la cantidad y la localización de sitios específicos en el gen.           | El número de fragmentos se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa, el tamaño en pb se determinó mediante PM estándar ( $\phi$ / Hind III). |
| Concentración de la enzima              | Una unidad (U) de enzima se define como la cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1 $\mu$ l de sustrato en una hora.    | La concentración de enzima se manejó en U/ml de solución y se determinó mediante diferentes ensayos con el sustrato.                                     |
| Tiempo y temperatura de digestión       | El tiempo necesario para que la digestión del fragmento se lleve a cabo a una temperatura determinada.                                   | Temperatura en °C (30-40).<br>Tiempo en horas (1-24)<br>Para determinar la temperatura y el tiempo óptimos se realizaron diferentes ensayos.             |
| Numero de aislados                      | Cada muestra de materia fecal positiva a <i>Giardia</i> se consideró un aislado.   |  |
| Condiciones de amplificación            | estas condiciones implican tiempo y temperatura de cada segmento del programa. Concentración de los reactivos y secuencia del iniciador. | Tiempo: Minutos<br>Temperatura: °C<br>Iniciadores: específicos para el gen <i>tsp11</i> de <i>G.lambli</i> a.  |

Tabla 1: variables importantes a considerar en el estudio



## MATERIAL

### BÁSICO

- Tubos Falcón de 50ml.(COSTAR)
- Micropipetas de 10, 50, 100 y 1000 $\mu$ l (COSTAR)
- Puntas estériles para micropipetas. (COSTAR)
- Tubos Eppendorf de 1 y 2ml de capacidad.(COSTAR)
- Molde de 8 x 10 x 0.5cm con peine de 20ml de capacidad.(Blo-Rad)
- Cámara horizontal de electroforesis para gel submarino.(Blo-Rad)
- Material básico de cristalería.(Merck)

### EQUIPO

- Baño metabólico.(JM Ortiz)
- Centrífuga RT6000B (Dupont)
- Vortex Genie 2 (Fisher)
- Espectrofotómetro DU640 (Beckman).
- Estufa de incubación (Queue).
- Termociclador (Perkin Elmer Cetus.)
- Fuente de poder (LKB Bromma).
- Transiluminador de luz UV (HOEFER).
- Cámara fotográfica instantánea. DS34 (Polaroid.)
- Microcentrífuga modelo 10 (COSTAR)

## REACTIVOS

- Cloruro de sodio (NaCl) 0.15M (4011621578 Merck)
- Etilen diamin tetracetato (EDTA) 0.5M y 1mM (E1105 Técnica Química)
- Proteinasa K 0.1mg/ml.(39450-01-6 Sigma)
- Lauril sulfato de sodio (SDS) 0.5% (L5750 Sigma)
- Fenol equilibrado pH 8 (P1037 Sigma)
- Cloroformo (9180-63 Baker)
- Alcohol isoamílico (Baker)
- Eter QP. (9240-63 Baker)
- Acetato de sodio 3M. (Sigma)
- Etanol QP. (103165)
- Trisma base 10mM (T1503 Sigma)
- RNAasa 200µg /ml (R5376 Sigma)
- Enzimas: (BioLabs) Hind III, Eco RI, Bam HI, Pst I.
- Agarosa para biología molecular 1% (N930-2774 P-Express)
- Ácido bórico (Sigma)
- Bromuro de etidio 0.5µg/ml. (E8751 Sigma)
- Kit de amplificación. PCR Reagent Kit. (N801-0055 Perkin Elmer Cetus.)

## METODOLOGÍA

### AISLAMIENTO DE DNA (Método fenólico)

Para obtener el DNA de los quistes presentes en materia fecal se empleo una técnica descrita por Sambrook<sup>83</sup> en 1989, la cual esta basada principalmente en el uso de disolventes orgánicos para lograr una separación de los ácidos nucleicos del resto de la materia celular.

De la muestra de materia fecal se tomaron aproximadamente 5mg de muestra, se resuspendió en 5ml de agua destilada y se homogeneizó perfectamente la muestra. Se centrifugó a 1000 rpm por 5 min y se tomaron aproximadamente 3ml de sobrenadante. Se agregaron 8.5ml de buffer de lisis (NaCl-EDTA). Posteriormente se añadió **proteínasa K** hasta una concentración de 20µg/ml y SDS (Duodecil sulfato de sodio) hasta una concentración final del 0.5%, se incubó la muestra durante 2 hr a 50°C. Una vez concluido el período de incubación se agregó un volumen de fenol precalentado a 60°C, seguida de una agitación vigorosa en vortex. Se realizó una centrifugación durante 10min a 5000 rpm a 4°C. En el sobrenadante se encontraba el DNA en solución, se recogió esta fase en un tubo limpio y se repitió el procedimiento de extracción con: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y eter.

Una vez obtenida la última fase acuosa se agregaron 2.5 volúmenes de etanol frío y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M para inducir la precipitación. Se mezcló suavemente hasta que la madeja de DNA se hizo evidente y se dejó precipitar durante 12hrs a -20°C, en seguida, se centrifugó durante 20min a 5000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante, una vez seca la pastilla se resuspendió en 1ml de TE (Tris-EDTA) y se

homogeneizó completamente, se agregaron 100µl de RNAasa y se colocó en un baño metabólico a incubar durante 30min a 37°C. Posteriormente se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamilico y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol frio y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, se incubó en hielo durante 20min para inducir la precipitación. En seguida se centrifugó en las condiciones anteriormente señaladas, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de DNA en agua miliq estéril. Las alícuotas se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Este procedimiento se realizó también con un cultivo axénico de *G.lambli* cepa **Portland-1**, la cual es una cepa de referencia, cultivado en medio **Diamond TY-S-33** para obtener DNA genómico y utilizarlo como control. Esta muestra se trabajó paralelamente con las demás en todos los procedimientos.

## AMPLIFICACIÓN por PCR

Se realizó una amplificación<sup>74</sup> a partir de 200ng de templado (DNA) en un volumen de reacción de 100µl, conteniendo: MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, una mezcla de deoxinucleótidos trifosforilados 10µM, 2.5U de Taq\* DNA polimerasa, 140ng/µl del Primer de sentido (+) 5'-ACGACGGTACTAAGGGCACGTG-3' y 140 ng/µl del Primer de reversa (-) 5'-TATCCTGGAGCTCACAGCTTACA-TGTTGTAGCTGCTCCA-3', Buffer específico para PCR 1X (10mM de Tris-HCl pH 8.3, 50mM de KCl). El programa de amplificación consistió en un periodo inicial de 4min a 95°C, 30seg a 95°C, 30seg a 58°C, 1min a 72°C (10 ciclos). seguido por 45seg a 94°C, 30seg a 60°C, 1.25min a 72°C (30 ciclos) y una extensión final de 10min a 72°C.

## CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se realizó una digestión<sup>84</sup> de todas las muestras de DNA amplificado en una mezcla de reacción de 30 $\mu$ l. con las siguientes enzimas Bam H1, Eco RI, Hind III y Pst 1.

En un tubo **ependorf** estéril se colocó 1 volumen de la solución de DNA amplificado equivalente a 1  $\mu$ g de DNA, se agregaron 3  $\mu$ l de buffer 10X específico para la enzima, se mezcló perfectamente y se adicionaron 65U de enzima, se mezcló nuevamente y se agregó agua estéril hasta completar 30 $\mu$ l. Enseguida se procedió a incubar a 37 $^{\circ}$ C durante 16 hrs La reacción se detuvo adicionando 5 $\mu$ l de EDTA 0.5 M a pH 8.

## ELECTROFORESIS

En un tubo **ependorf** se colocaron 10 $\mu$ l de la muestra de DNA digerida más 1 $\mu$ l de colorante jugo azul 10X (Xilencianol-Azul de bromofenol) y se depositó la mezcla en un pozo del gel\* para correrlo electroforéticamente a 100 V por 45 minutos, posteriormente se observó en un transiluminador de luz UV para apreciar el corrimiento, y se tomó una fotografía del gel.

\*Ver apéndice para la preparación del gel.

# DIAGRAMA DE FLUJO

EXTRACCION DE DNA A  
PARTIR DE MATERIA  
FECAL

AMPLIFICACION POR  
PCR  
DEL GEN Tsp11 DE  
*G.lambli*.

CORTE CON ENZIMAS  
DE RESTRICCION

ELECTROFORESIS

# EXTRACCION DE DNA

MATERIA FECAL

LISIS CELULAR

EXTRACCION CON DISOLVENTES ORGANICOS

PRECIPITACION

ELIMINACION DEL RNA

EXTRACCION CON DISOLVENTES ORGANICOS

REPRECIPITACION

# REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

## MEZCLA DE REACCION

- 300ng DE DNA
- 2.5 u DE Taq POLIMERASA
- Iniciadores (tsp 11)
- dNTP's 10 $\mu$ M
- MgCl<sub>2</sub> 25mM
- 100 $\mu$ L DE BUFFER 1X

## CONDICIONES DE AMPLIFICACION

- 4 MIN 95°C
  - 30SEG 95°C
  - 30SEG 58°C
  - 1MIN 72°C
  - 45SEG 95°C
  - 30SEG 60°C
  - 1.25MIN 72°C
  - 10 MIN 72°C
- 10 CICLOS
- 30 CICLOS



## CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCION

1 $\mu$ g DE DNA  
AMPLIFICADO

65U DE ENZIMA  
EN 30 $\mu$ l DE BUFFER 1X

INCUBAR 37 $^{\circ}$ C  
POR 16 HRS.

ADICIONAR 5 $\mu$ l  
DE EDTA 0.5mM pH 8

# ELECTROFORESIS

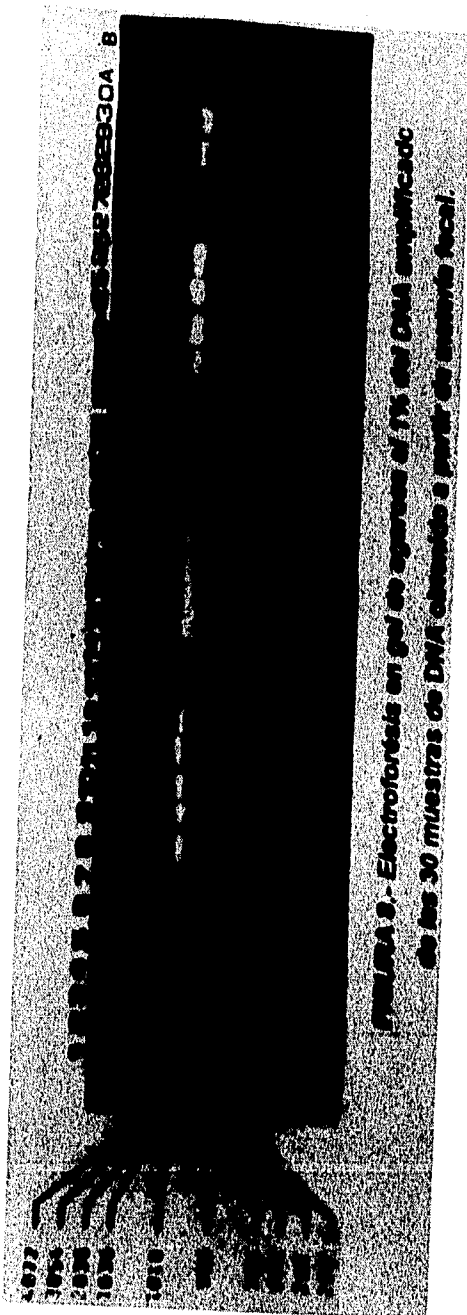
15 $\mu$ L DE DNA Y  
2 $\mu$ L DE JUGO AZUL

COLOCAR EN UNA CAMARA  
Y ADICIONAR TBE

COLOCAR CADA MUESTRA  
EN UN POZO

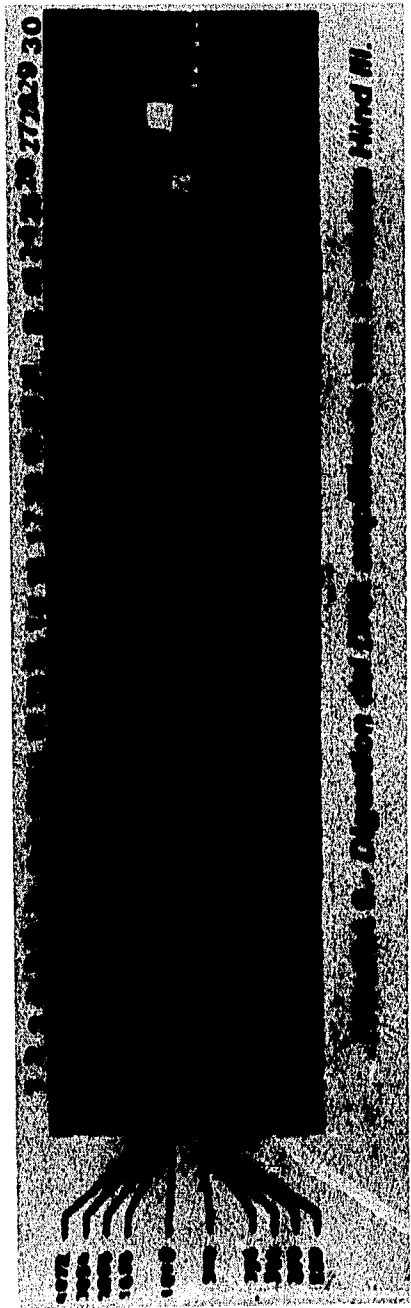
CORRER A 100V  
DURANTE 30min

# RESULTADOS



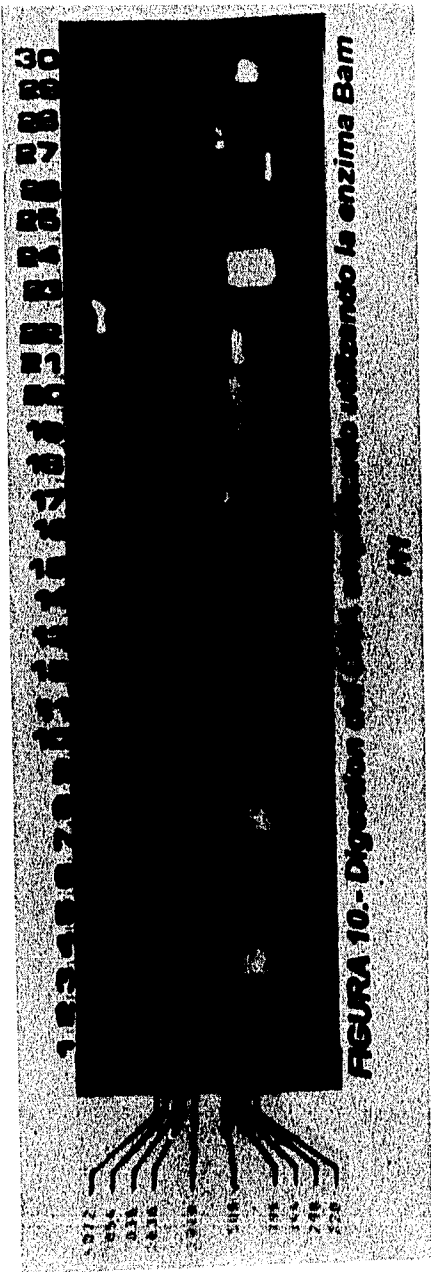
**FIGURA 8.- Electroforésis en gel de agarosa al 1% del DNA amplificado de las 30 muestras de DNA obtenido a partir de materia fecal.** En la figura se observan las amplificaciones de las muestras de DNA de quistes aisladas a partir de materia fecal, se observa la banda correspondiente al gen *tsp11* de aproximadamente 520 pares de bases, utilizando como control positivo una amplificación de DNA aislado de un cultivo axénico de *Giardia lamblia* (A) y como control negativo la mezcla de reacción con DNA de *Entamoeba histolytica*.

La reacción en cadena de la polimerasa en este caso resultó de gran utilidad para incrementar la cantidad de DNA, de tal manera que, su manipulación fuera posible. En este caso en algunas muestras se observa un pequeño barrido, ya que no fue posible estandarizar la concentración de DNA de *Giardia lamblia*, esto debido a que se partió de 200ng de DNA total, de diferentes orígenes, y es por ello que la concentración final es variable para cada amplificado y por ello se observan bandas de diferente intensidad, sin embargo el tamaño del fragmento amplificado no se ve modificado en ningún momento.



**FIGURA 9.- Digestión del DNA amplificado utilizando la enzima Hind III.** El DNA amplificado correspondiente al gen *tsp11* fue digerido con la enzima Hind III, la cual proviene de una cepa de *H. influenzae* y reconoce la secuencia A/AGCTT.

La digestión se llevó a cabo con 65U durante 16hrs y se observó el patrón electroforético observado en la figura, en algunos casos se muestran dos o más sitios de restricción y en otros solamente uno. El 47% de los aislados de *Giardia* mostró un solo corte de restricción de 220 o 298 pares de bases. Dos fragmentos de restricción se observaron en el 44% de los aislados, mientras que, en un aislado se observan tres cortes y en el 6% de los casos se observan multicortes. Estos datos sirvieron para agrupar las muestras, lo que se observa en la tabla 1.



**FIGURA 10.- Digestión del DNA amplificado utilizando la enzima Bam H1.** La enzima Bam H1 proviene de una cepa de *Bacillus amiloliquefaciens* y reconoce e hidroliza la secuencia palindrómica G/GATC.

De igual forma que con la enzima Hind III, se realizó la digestión con Bam H1, en idénticas condiciones.

Con esta enzima se observaron patrones de electroforésis muy peculiares, ya que, con gran frecuencia se observaron barridos muy extensos, sin embargo se desconoce si fue debido a la degradación de DNA o a la presencia de multicortes.

Con la enzima Bam H1 se observó en el 67% de los casos un solo fragmento de 220 pares de bases. dos fragmentos en el 20% y tres en el 3%, además en el 10 % de los casos se observó la presencia de multicortes. Sin embargo lo más relevante de esta figura fue la presencia de barrido como ya se menciona antes.



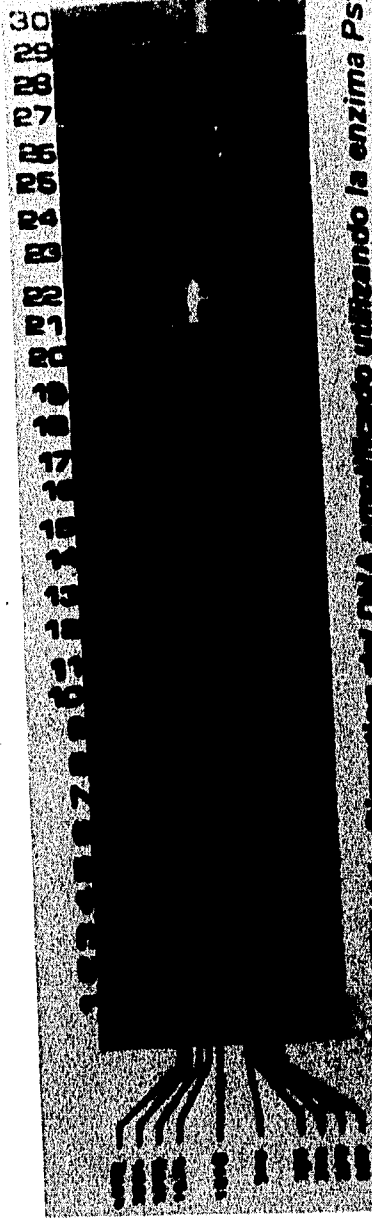


Figura 11.- Digestion del DNA amplificado utilizando la enzima Pst 1

**FIGURA 11.- Digestión del DNA amplificado utilizando la enzima Pst 1**

La enzima pst 1 proveniente de la bacteria *Providencia stuartii* se utilizo para digerir los DNA amplificados de las treinta muestras. Esta enzima que reconoce la secuencia CTGCA/G se trabajo a 37°C duranté 16 hrs y presento el patrón de restricción mostrado en la figura.

Con la enzima Pst I fue muy frecuente observar múltiples sitios de restricción del DNA, sin embargo a diferencia de la enzima Bam H1 en este caso, aunque se observan barridos, estos no se observan tan difusos. En este caso se observan multicortes en el 13% de los aislados , un corte en el 34%, dos fragmentos en el 43% y tres en el 10%.



**FIGURA 12 - Digestion del DNA amplificado utilizando la enzima Eco R1**

**FIGURA 12.- Digestión del DNA utilizando la enzima Eco RI**

Esta enzima es obtenida de *Escherichia coli* y reconoce la secuencia G/AATCC, fue utilizada para digerir el DNA amplificado, para ello se emplearon 65 U, incubando a 37°C durante 16hrs.

En este caso no se observaron multicortes y en la mayoría de las muestras (50%) se observaron 2 fragmentos de tamaño muy similar. En el 47% de los casos se observó solo un fragmento de restricción y solo en una muestra equivalente al 3% se observaron tres fragmentos.

## CLASIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

| <i>GRUPO</i>               | <i>Hind III</i> | <i>Bam HI</i>   | <i>Pst I</i>     | <i>Eco RI</i>    |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| GRUPO I<br>220 o 298 pb    | 14 /30<br>(47%) | 20 /30<br>(67%) | 10 /30<br>(34 %) | 14 /30<br>(47%)  |
| GRUPO II<br>220 Y 396 pb   | 13 /30<br>(44%) | 6 /30<br>(20 %) | 13/30<br>(43%)   | 15 /30<br>(50 %) |
| GRUPO III<br>220,344,396pb | 1 /30<br>( 3% ) | 1 /30<br>( 3% ) | 3 /30<br>(10 %)  | 1/30<br>(3%)     |
| GRUPO IV<br>+ de 3 sitios  | 2 /30<br>(6%)   | 3/30<br>(10%)   | 4 /30<br>(13%)   |                  |

**TABLA 2: Clasificación de las 30 muestras de DNA digerido de acuerdo al número y tamaño de cortes obtenidos con las diferentes enzimas de restricción.** En la tabla anterior se presenta un resumen de los datos obtenidos durante la digestión. En la tabla se presentan los cortes de las 30<sup>0</sup> muestras de DNA de acuerdo al número y tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas, y la clasificación de las mismas en cuatro grupos, dentro de los cuales se incluyeron todas las muestras.

## DISCUSIÓN

Este estudio describe el polimorfismo genético de *G.lambli*a determinado por el número y tamaño de los segmentos de restricción (RFLP's) obtenidos tras un tratamiento enzimático del gen *tsp11* con endonucleasa específicas de restricción. En primer lugar se realizó una extracción de DNA de *G.lambli*a a partir de muestras de materia fecal, mediante la técnica descrita por Sambrock en 1989, la cual esta basada en el uso de disolventes para eliminar materia orgánica celular de una solución acuosa, en la cual permanecerán solo los ácidos nucleicos, posteriormente utilizando los iniciadores específicos propuestos por Ey P.L. y colaboradores en 1992, se amplificó el fragmento correspondiente al gen *tsp11*, logrando obtener un segmento de 520pb. La amplificación por PCR además de proporcionar moléculas del gen en cantidades suficientes para visualizarlo y manipularlo experimentalmente, presentó la utilidad de comprobación del diagnóstico de *Giardia* en la muestra biológica, ya que se amplifica un segmento específico para este parásito.

El tratamiento del DNA amplificado con endonucleasas de restricción, se llevó a cabo con las enzimas Hind III, Bam HI, Pst I y Eco RI y mediante una electroforesis en gel de agarosa fue posible determinar la actividad enzimática sobre las cadenas de DNA, esto a su vez, permitió distribuir las treinta muestras en cuatro grupos (tabla 2), de acuerdo al número y tamaño de los fragmentos obtenidos después de la digestión. Con las enzimas Hind III y Pst I fue posible distinguir la presencia de cortes en el gen *tsp11*, dando como resultado fragmentos de 220, 396, 344pb y en algunos casos más de cuatro fragmentos, esto permitió determinar diferencias a nivel genético del gen *tsp11*. Con la enzima Eco RI se dio un caso similar, es decir, se observó la presencia de uno o dos cortes, de igual forma que con las enzimas antes mencionadas excepto que, en este

caso no hubo multicortes en ninguno de los aislados. Con la enzima Bam H1 se observó una situación opuesta, ya que, en la mayoría de los aislados se observaron varios fragmentos incluyendo la banda común a los demás aislados, sin embargo con esta enzima, los patrones visualizados en los geles presentaban mucho barrido, lo que puede indicar que la enzima tiene una gran actividad sobre la cadena de DNA, y que ocasiono la degradación de la misma. Estos datos ponen de manifiesto el polimorfismo genético del gen *tsp11*, el cual es específico de *Giardia*, y codifica para una proteína rica en cisteína que se encuentra en la superficie del trofozoito, lo que a su vez sugiere que la diferencia en el gen *tsp11* podría explicar los diferentes niveles de patogenicidad que presenta este parásito frente al huésped, ya que se ha observado que la cantidad de cisteína en las proteínas de superficie determinan la afinidad por los enterocitos, en el mecanismo de adherencia, lo que hace a *Giardia* más resistente a la respuesta del organismo, así como a algunos fármacos, sin embargo, para poder afirmar este hecho se debe realizar un estudio mas extenso, en el cual se relacione el cuadro clínico del paciente con giardiasis con el patrón de restricción de *G.lambli*a.

Este criterio ya ha sido empleado previamente para diferenciar y agrupar aislados clonados de *Giardia* utilizando genes diferentes al gen *tsp11*, por ejemplo, existen algunos trabajos basados en la amplificación por PCR de un gen ribosomal, lo que ha permitido observar la diferencia entre cepas humanas y de otros huéspedes.<sup>79</sup> Por otro lado, algunos trabajos realizados sobre el polimorfismo de *Giardia*<sup>85</sup> mencionan metodologías similares a la que se llevo a cabo en este trabajo, sin embargo, en su mayoría se han trabajado con material genético manipulado en el laboratorio con técnicas de ingeniería genética y este hecho modifica en alguna forma el arreglo molecular del DNA sobre todo en un genoma tan

susceptible de cambiar cuando hay cambios en su microambiente, como es el de *Giardia*, ya que se ha demostrado que al aislar trofozoítos de pacientes con giardiasis crónica y manipularlos genéticamente se observan características diferentes antes y después de cultivarlas axenicamente<sup>86</sup>, lo que demuestra la gran plasticidad del genoma de *Giardia* para modificar sus características por mecanismos que no se han determinado aún, también se ha observado la variación antigénica de las proteínas de superficie de los trofozoítos cultivados axenicamente, esto último ha podido demostrarse, mediante estudios inmunológicos con anticuerpos monoclonales.<sup>87</sup> En el presente trabajo se ha utilizado material genético de quistes de *Giardia* obtenidos directamente de pacientes pediátricos, lo que conlleva un proceso más corto y más representativo del estado clínico del paciente, ya que no se da la oportunidad de que se lleven a cabo arreglos genéticos porque se obtiene el DNA inmediatamente.

El polimorfismo genético de *Giardia* ha sido un tema de interés en los últimos años, tomando en cuenta sobre todo que hasta hace poco este parásito se consideraba comensal y no se le daba la importancia que en realidad merece, por otro lado debido a que el genoma de *Giardia* es muy susceptible de cambiar al modificar su microambiente, su estudio ha sido muy difícil y, por lo tanto se conoce aún muy poco acerca de la genética, fisiología y en general biología de *Giardia*, por lo que este trabajo pretende contribuir al entendimiento de la biología de *Giardia lamblia*, con el propósito de comprender mejor el desarrollo de la infección y de esta manera lograr tratamientos más adecuados con el fin de mejorar la calidad de vida de la población en edad pediátrica, ya que si bien la giardiasis no es una enfermedad letal, si afecta de manera significativa el desarrollo físico e intelectual de los niños.



## CONCLUSIONES

Los patrones electroforéticos del DNA de *Giardia lamblia*, correspondientes al gen *tsp11*, que fueron sometidos a digestión con diversas enzimas de restricción (Bam H1, Pst 1, Eco R1 y Hind III) mostraron diferencias significativas con base en el número y tamaño de los fragmentos visualizados mediante electroforesis. Estos resultados indican que el gen *tsp11*, el cual codifica para una proteína de superficie rica en cisteína, presenta polimorfismo genético, lo cual puede estar directamente relacionado con los mecanismos de patogenicidad, sin embargo para ratificar este hecho se requiere de un estudio que relacione los patrones de restricción con el cuadro clínico del paciente.

La metodología llevada a cabo represento una herramienta útil para poner de manifiesto el polimorfismo de este gen, lo que significa que pueden ser utilizadas para lograr avanzar en el conocimiento de la biología de *Giardia lamblia*, en beneficio de la población pediátrica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Zavala JT, Aguilera RL. Microbiología y Parasitología Médica. México D.F: Editorial Méndez editores, 1991: 77-80.
2. Meyer EA. Giardiasis. Am J Epidemiol 1980; 3: 1-12.
3. Faust EC. Parasitología Clínica. México, D.F: Editorial Salvat, 1981: 59-60.
4. Dobell C. The discovery of the intestinal protozoa in man. Proc R Soc Med: Section of history of medicine 1920; 13: 11-15.
5. Kreier JP. Intestinal Flagellates. En: Parasitic Protozoa. USA: Plenum Press. 1990, vol II. 69-99.
6. Feely DE. The biology of *Giardia spp* in parasitic diseases. En: Meyer EA. Giardiasis. New York City: Elsevier, 1990: 1-49.
7. Jaroslav K. Nohynkova. Morphology of *Giardia*. Intestinal Flagellates. En: Parasitic Protozoa. USA: Plenum Press. 1990, vol 2. 69-99.
8. Campbell SP. *Giardia sp*: comparison for electrophoretic karyotypes. Exp Parasitol 1990; 71: 470-82.
9. Feely DE. Morphology of *Giardia agilis*: observation by analysis scanning electron microscopy and interference reflection microscopy. J Infect Dis 1985; 37: 691-93.
10. Holberton DV. Attachment of *Giardia*. J Exp Biol 1974; 60: 207-221.
11. Adam. The biology of *Giardia sp*. Microbiol Rev. 1991; (4): 706-32.
12. Reiner DS. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukariote *G. lamblia*. J Cell Biol 1990; 53: 142-53.
13. Feely DE. Localisation of acid phosphatase activity *G.lambliia* and *G. muris* trophozoites. J Protozool 1987; 34: 80-3.
14. Lindmarck DG. *G.lambliia*: localitation of hidrolase activities in lisosome like organelles of trophozoites. Exp Parasitol 1988; 65:141-7.

15. Wiesehanh GP. *G.lambli*a: autoradiographic analysis for nuclear replication. *Exp Parasitol* 1989; 58: 94-100.
16. Lev BH. Lectin activation in *G.lambli*a in host protease: a novel host parasite interaction. *Science* 1986; 232: 71-3.
17. Erlandsen SL. High resolution electron microscope evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *G.muris* and *G. duodenalis*. *J Parasitol* 1989; 75: 787-97.
18. Jarroll EL. *G.lambli*a cyst wall specific carbohydrate: evidence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 2: 187-96.
19. Feely DE. Ecistation of *G.muris* induced by phosphate- bicarbonate medium. *J Parasitol* 1991; 77: 441-8.
20. Farthing MJ. Natural history of the *Giardia* infection of the infant and children. *Am J Clin Nutr* 1990; 43: 395-405.
21. Gilman RH. Epidemiology and serology of *G.lambli*a in a developing country. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 79: 469-73.
22. Meyer EA, Jarroll E. Reviews and commentary Giardiasis. *J epidemiol* 1980; 111: 1-11.
23. Parasite-related diarrhoeas. Informe de un grupo científico de la OMS. Bulletin de l'organization mondiale de la saule. *Bull World health organ* 1980; 56: 819-30.
24. Cruz LA, Cortes RR. Parasitosis intestinales en el Edo de Puebla. *Rev Cient Nat Apli Elementos* 1987; 2: 25-35.
25. Salazar PM, Alonso GT. Frecuencia de parasitosis intestinales en un grupo de escolares en copilco el alto y comparación de los métodos coproparasitológicos en relación a su capacidad diagnóstica. *Rev Med Patol* 1988; 35: 77-82.

26. Novotny TE. Prevalence of *G.lamblia* and Risk factors for infection among children attending daycare facilities in Denver. Public Health Reports 1990; 105(3): 72-5.
27. Varga L. Infestacion par *G.lamblia* in giardirie. Arch Fr Pediatr 1990; 47: 5-8.
28. Farthing MJ. Diarrhoeal disease: current concepts and futere challengers pathogenesis of giardiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87 suppl 3: 17-21.
29. Bernal RR. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Diagnóstico parasitológico, INDRE 1995;465-75.
30. Mason PR. epidemiology of *G.lamblia* infection in children. Am J Trop med hyg 1987; 37: 277-82.
31. Schmerin MJ. Giardiasis: asociation with homosexuality. Ann Intern Med. 1978; 88: 801-3.
32. Beck JW. Medical Parasitology. 3th. USA: The CV MusbCo, 1981:41-6
33. Gillon J. Clinical studies in adults presenting with giardiasis to a gastrointestinal unit. Scott Med J. 1985; 30: 89-95.
34. Barbour AG. An Outbrake of giardiasis in a group of campers. Am J Trop Med Hyg 1976; 25; 384-9.
35. Erlandsem. Trophozoite motility and the mechanism of atachment. : *Giardia and Giardiasis: biology, pathology and epidemiology*. New York: Plenum Press, 1984: 33-63.
36. Ganguly. electron microscopic studies of jejunum of mice infected with *G.lamblia*. Indian J Med Res 1985; 81: 102- 110.
37. Buret A. Pathophysiology of small intestinal malabsortion in gerbils infected with *G.lamblia*. Gastroenterology 1992; 103: 506-13.

38. Feely DE. Ultrastructural evidence for the presence of bacteria, viral like particles and mycoplasma like organisms associated with *Giardia spp.* J Protozool 1988; 35:151-8.
39. Clyne CA. Fever and urticaria in acute giardiasis. Arch Intern Med 1989;939-40.
40. Shaw RA. Stevens MB. The reactive arthritis of giardiasis. J Am Med Assoc 1987; 251: 2734-5.
41. Anderson ML. Intestinal giardiasis associated with ocular inflammation. J Clin Gastroenterol 1985; 7: 169-72.
42. Kilian . Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their supretion by bacterial immunoglobulines A proteases. Microbiol Rev 1988; 52:296-303.
43. Crisóstomo-Vázquez MP. Identificación de las proteínas del disco ventral de *G.lambli*a con punto isoeléctrico de 6-8. México, D.F. 1995. UNAM.
44. Sullivan PB. Evaluation of specine serum anti-giardia IgM antibody response in diagnosis of giardiasis in children. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 55: 748-49.
45. Nash TE. Frequency of variants antigens in *G.lambli*a. Exp Parasitol 1992; 71: 415-421.
46. Belosevic MG. *G.lambli*a infections in mongolian gerbils: an animal model. J Infect Dis 1989; 147: 222-6.
47. Hill DL. Lymphocyte polypheration in Peyer's patches of *G.muris* infected mice. Infect Immunol 1990; 58: 2683-5.
48. Lewis PD. Corysone induce recrudescence of *G.lambli*a infection in gerbils . Am J Trop Med Hyg 1987; 36: 33-40.
49. Smith PD. Human host response to *G.lambli*a spontaneous killing by mononuclear leucocytes " In vitro". J Immunol 1990; 128: 1372-6.

50. Kaplan DS. Effector mechanism of host resistance in murine in giardiasis: specific IgG and IgA cell mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1985; 134: 1975-81.
51. Goka AK. The relative methods of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of the giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 66-7.
52. James S. Giardiasis. *Pediatrics in review* 1993; 14(7): 284-5.
53. Sterling CR. *Giardia* detection using monoclonal antibodies recognizing determinants of "in vitro" cysts. *Adv Giar Res* 1988; 219:22.
54. Craft JR. Diagnosis of giardiasis by conrainmunoelctroforesis of faeces. *J Infect Dis.* 1986; 145: 499-504.
55. Goldin AJ. Efficient diagnosis of giardiasis by among nurse and primary school children in Santiago, Chile by capture ELISA for the infection by faecal *Giardia* antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 42: 538-45.
56. Jimenez CE. Delgadillo MS. Flores LA. Reacción en cadena de la polimerasa como prueba diagnóstica de la giardiasis. *Bioquimia* 3 1995; 20(80): 325-329.
57. Davidson RA. Issues in clinical parasitology: treatment of giardiasis. *Am J Gastroenterol* 1988; 79: 256-61.
58. Paget TA. respiration in the cysts and trophozoites of *G.muris*. *Gastroenterol* 1989; 76: 757-69.
59. Gilman RH. Rapid reinfection by *G.lambliia* after treatment in a hiperendemic third world community. *Exp Parasitol* 1988; 11: 343-5.
60. Botrhoyd JC. An unusually compact rDNA repeat in the protozoan *G.lambliia*. *Nucleic Acid Res* 1987;15: 4065-84.

61. Peattie DA. Nucleotide sequence of a second  $\alpha$ -giardine genes and transcript of *G.lambli*a. Mol Biochem Parasitol 1992; 50(1):95-104.
62. Kabnick KS. In situ analysis reveal that the two nuclei of *G.lambli*a are equivalent. J Cell Sci 1990; 95: 353-60.
63. Fan JB. *G.lambli*a: Haploide genome size determined by pulsed field gel electrophoresis is less than 12 Mb. Nucleic Acid Res 1991; 19: 1905-8.
64. McCuthan. Antigenic variation of a cysteine rich proteine in *G.lambli*a. J Exp Med 1988; 167: 109-118.
65. Morgan UM. RAPD analysis of *Giardia* DNA and correlation with Isoenzima data. Trans R Trop Med Hyg 1993; 867: 702-5.
66. Gillin FP. Isolation and expretion of the gene for a major surface protein of *G.lambli*a. Proc Nat Acad Sci 1990; 87: 4463-67.
67. Edlind TD. Inusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *G.lambli*a. Nucleic Acid Res 1989; 15: 7889-901.
68. Sogin ML. Philogenetic meaning of kingdom concept. Science 1989; 243: 75-77.
69. Kozak M. An analisis of 5'noncoding sequences from 699 vertebrate messenger rRNAs. Nucleic Acid Res 1987; 15: 8125-8148.
70. Kozak M. The scanning for traslation: an update. J Cell Biol 1989; 108: 229-241.
71. Healey AR. Complete nucleotide sequence of the ribosomal RNA tandem repeat unit from *G.intestinalis*. Nucleic Acid Res 1990; 18: 4006.
72. Aggarwal A. A heat proteine gene in *G.lambli*a unrelated to HSP70. Nucleic Acid Res 1989; 18: 3409.

73. Mowatt T. C-terminal sequence conservation among variant specie surface proteins of *G.lamblia*. Mol Biochem Parasitol 1991; 99: 2215-28.
74. Ey PL. Two genes encoding 70 KDa surface trophozoites of the binucleate protozoan parasite *G. intestinalis*. Gene 1992; 129 (2): 237-62.
75. Barrera SH. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y desarrollo 1991; 50-60.
76. Barrera SH. Genética Moléculas en México. Ciencia y desarrollo 1991; 17: 63-80.
77. Stryer L. Biochemistry 3rd edition. W H Freeman and company. New York 1988. Tomo 1:118-20
78. Propiedades de algunas enzimas de restricción. Clontech catalogues 1992-93. Uniparts S.A. división laboratorios.
79. Ey PL. *Giardia intestinalis*: detection of a major genotypes by restriction lenght polymorphim. J General Microbiol 1992; 138: 2629-37.
80. Ey PL. Differentiation of major genotypes of *G.intestinalis* by polimerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. Parasitology 1993; 106: 347-56.
81. Nash TE. Surface antigen variability and variation in *G.lamblia*. Parasitol Today 1992; 8: 229-34.
82. Andrews RH. *G.intestinalis* : electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol 1989; 19: 183-90.
83. Sambroock J. Molecular cloning. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989.
84. Appley EW. Diagnostic restriction enzyme digestion. Focus 1984; 6: 1-6.



85. Mayrhofer G. Andrews RH. Division of *Giardia* isolates from human into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzyme encoded and 27 loci and comparison with *G. muris*. *Parasitology* 1995; 111: 11-17.
86. Butcher PD. Phenotypic and genomic variation in *G. lamblia* isolates during chronic infection. *Gut* 1994; 35(1): 51-4.
87. Hopkins RM. Thompson RC. Differences in antigen expression within and between 10 isolates of *G. duodenalis*. *Acta Tropica* 1993; 54(2): 117-24.

## APÉNDICE 1

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

#### AMORTIGUADOR DE LÍISIS

Se pesaron 8.7750g de NaCl y 37.22g de EDTA y se disolvieron en 800ml de H<sub>2</sub>O milli-q estéril, se aforó a 1000ml y se almacenó a 4°C. A este amortiguador se agrega la Proteinasa K y el SDS para llevar a cabo la lisis celular.

#### PROTEINASA K

Se pesaron 5mg de Proteinasa K y se disolvieron en 3ml de H<sub>2</sub>O milli-q estéril, se aforó a 5ml y se almacenó libre de la luz a 4°C.

#### SDS (DODECIL SULFATO DE SODIO) 0.5%

0.5g de SDS se disolvieron en 80ml de H<sub>2</sub>O milli-q estéril, y se aforaron a 100ml.

#### FENOL ESTABILIZADO A pH 8

Se fundió el fenol en un baño a 68°C, una vez líquido se añadieron 0.05g de 8-hidroxiquinoleína como antioxidante. Se realizaron dos extracciones con un volumen igual de TRIS-HCl 1M pH 8 y varias con TRIS-HCl 100mM pH 8, hasta que el fenol se mantuvo a pH 8. Se almacenó en una capa acuosa de TRIS-HCl a 4°C.

#### FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO (25:24:1)

En un matraz volumétrico de 500ml. se colocaron 240ml de cloroformo QP y 10ml de alcohol isoamílico y posteriormente se agregaron 250ml de fenol equilibrado pH 8, se alicuotó y se almacenó a 4°C.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### ACETATO DE SODIO 3M

Se pesaron 40.82g de acetato de sodio y se disolvieron en 80ml de H<sub>2</sub>O milli-q estéril, se aforó a 100ml. Se almaceno a 4°C.

### TE (TRIS 10mM- EDTA 1mM)

Se pesaron 1.211g de TRIS y 0.3720 de EDTA , se disolvieron en 800ml de H<sub>2</sub>O milli-q estéril, y se aforaron a 1000ml.

### TBE (TRIS 0.89M-ACIDO BÓRICO 0.89M-EDTA 0.025m

Se pesaron 53.89g de TRIS, 27.5g de ácido bórico y 4.653 de EDTA, se adicionaron y disolvieron uno por uno en 300ml de agua milli-q estéril y se ajusto el pH a 8.3-8.6. Posteriormente se aforó a 500ml.

### RNAasa libre de DNAasa 20Mg /ml.

Se tomaron 100 mL de Tris 10mM, y 30ml de NaCl 15mM. Posteriormente se adicionaron 2mg de ribonucleasa (tipo 1-A). Se agitó hasta disolver y se aforó a 10ml con agua milli-q estéril. Se hirvió la solución durante 20min. Se formaron alícuotas de 1ml c/u y se almacenó a -20°C .

### JUGO AZUL

Este colorante se utiliza para cargar las muestras de DNA en el gel de electroforesis y esta constituido por:

azul de bromofenol 0.25%, Xilen cianol 0.25%, glicerol al 50% y 1mM de EDTA.

## GLOSARIO

A continuación se enlistan algunos términos, siglas y abreviaturas de utilidad para la mejor comprensión del texto.

- **A** Inicial con la que se denomina la base púrica Adenina.
- **Antígeno** Molécula de origen proteico, capaz de desencadenar una respuesta inmunológica.
- **Bam HI** Enzima de restricción cuyo huésped de origen en *B. amiloliquefaciens* y que reconoce la secuencia G/GATC.
- **BE** Bromuro de etidio agente químico homólogo a las bases nitrogenadas lo que le da la propiedad de intercalarse entre la cadena de DNA.
- **C** Citocina (base pirimidica).
- **DNA** Ácido desoxiribonucleico.
- **DNA polimerasa** Enzima capaz de incorporar nucleótidos trifosforilados a una cadena naciente de DNA.
- **Duodeno** extremo del intestino delgado próximo al estómago.
- **Eco RI** Enzima de restricción obtenida a partir de *E. coli*.
- **EDTA** Ácido etilen diamin tetra acetico.
- **Eucariontes** Células que presentan un núcleo definido y una organización citoplasmática definida.
- **ELISA** Enzyme linked Immuno-sorbent assay. Técnica inmunológica para la detección de anticuerpos.
- **G** Base pirimidica Guanina
- **Hind III** Enzima de restricción obtenida de *H. influenzae*.
- **IgA** Inmunoglobulina tipo A.
- **IgE** Inmunoglobulina tipo E.
- **IgG** Inmunoglobulina tipo G.

- **IgM** Inmunoglobulina tipo M.
- **Ileon** Parte terminal del intestino delgado próximo al intestino grueso.
- **Kb** Kilobases (1 Kb= 1000pb)
- **Micras** ( $\mu$ ) Unidad de longitud equivalente a 0.0001 m.
- **MgCl<sub>2</sub>** Cloruro de magnesio.
- **mM** Unidad de concentración equivalente a 1/1000 M.
- **Molar** M. Unidad de concentración que representa  $6,023 \times 10^{23}$  moléculas.
- **mRNA** RNA mensajero.
- **ng** nanogramos ( $10^{-9}$  g)
- **Pb** Pares de bases
- **PCR** Siglas en ingles de la Reacción en cadena de la polimerasa.
- **pH** Potencial de hidrógeno.
- **Pst 1** Enzima de restricción obtenida a partir de *P. stuartii*
- **QP** Químicamente puro.
- **rDNA** DNA ribosomal
- **RFLP** Restriction fragment length polymorphism.
- **RNA** Ácido ribonucleico.
- **RNAasa** Enzima capaz de hidrolizar la cadena de RNA.
- **SDS** Dodecil sulfato de sodio.
- **T** Timina
- **TBE** Trizma - Borato -EDTA. Buffer de corrimiento para electroforésis.
- **TE** Trizma- EDTA.
- **Transcripción** Proceso mediante el cual se sintetiza mRNA mensajero a partir de una cadena molde de DNA, por acción de la RNA polimerasa.
- **UV** Ultravioleta.
- **V** Volts