



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *crp136* DE TROFOZOÍTOS DE

***Giardia intestinalis* DE 10 AISLADOS OBTENIDOS DE DIFERENTES**

HOSPEDEROS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GONZÁLEZ RETE BERENICE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA PONCE MACOTELA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: M. EN C. MARGARITA CABRERA BRAVO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GONZÁLEZ RETE BERENICE** con número de cuenta **304120176**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *crp136* DE TROFOZOITOS DE *Giardia intestinalis* DE 10 AISLADOS OBTENIDOS DE DIFERENTES HOSPEDEROS**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA PONCE MACOTELA**:

Presidente: DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
Vocal: DR. JOSÉ HUGO AGUILAR DÍAZ
Secretario: M. EN C. MARGARITA CABRERA BRAVO
Suplente: M. EN C. LAURA MARGARITA MÁRQUEZ VALDELAMAR
Suplente: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de noviembre de 2015

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Programa de Becas CONACYT por otorgarme la beca con número: 545229

Al Programa de Becas Mixtas 2014–MZO2015 MOVILIDAD EN EL EXTRANJERO CONACYT por otorgarme la beca de Estancia de Investigación en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, España, con número: 290842

Al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) Convocatoria 2014, por otorgarme el apoyo económico para Congreso Internacional “8th Cuban Congress of Microbiology and Parasitology, 5th National Congress of Tropical Medicine and 3th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba”

A mi tutora:

Dra. Martha Ponce Macotela

A mi Comité Tutorial:

M. en C. Margarita Cabrera Bravo

Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Gracias

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi más profundo agradecimiento por ser mi Institución formadora, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado y por la mejor Universidad de México.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Mi profundo agradecimiento a la Dra. Martha Ponce Macotela por la dirección del presente trabajo, por aceptarme en el laboratorio y por la formación en el campo de la investigación.

A mi comité tutorial, M. en C. Margarita Cabrera Bravo y Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales; por el apoyo, aportaciones, constantes revisiones y el tiempo dedicado a mi formación académica y profesional.

Al jurado formado por el Dr. Rogelio Aguilar Aguilar, Dr. José Hugo Aguilar Díaz y M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar; por sus consejos, aportaciones y sus valiosas contribuciones para la realización de esta tesis.

Al Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, por su hospitalidad, apoyo, aprendizaje y observaciones constantes durante mi estancia en su laboratorio, en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España.

Al Laboratorio de Parasitología Experimental de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría por permitirme realizar mi proyecto de tesis, así como al personal, al Biol. Mario Noé Martínez Gordillo y M. en C. Silvia Caballero Salazar, por sus observaciones al presente trabajo y su accesibilidad. A Charlie por su amistad y por ayudarme con mi material.

Al M. en C. Aarón Rodríguez Caballero, por todo el tiempo y paciencia dedicado en la supervisión de mi trabajo durante el desarrollo de esta tesis por apoyarme siempre que lo necesite y su constante accesibilidad, por su amistad y apoyo incondicional, muchas gracias.

A mis grandiosos compañeros con los que conviví en el laboratorio de Parasitología, a la M. en C. Laura Soto Serna, a la M. en C. Rocío Ruiz Manzano, al Biol. Christian García Ávila y al P. de Biol. Uriel Martínez Hernández. Muchas gracias por todo su apoyo, son unas excelentes personas.

DEDICATORIAS

A mis padres, Daniel González Zuñiga y Margarita Rete Ramírez, quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede heredársele a un hijo: amor. Que sin escatimar esfuerzo alguno ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho y a quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aun con las riquezas más grandes del mundo. Por eso y más los amo. Gracias.

A mi hermano Daniel González Rete, por su gran cariño, por todas más aventuras y los momentos alegres que hemos vivido, gracias por tu apoyo siempre que lo necesite, porque eres una gran persona de la que he aprendido mucho, pero sobre todo gracias por estar ahí cuando te necesito. Te quiero hermano.

A mi familia que ha estado presente en mi formación y que han formado parte de mi inspiración a lo largo de mi vida.

A mis grandes amigos de la Facultad de Ciencias Luis Alfredo Florián, Isabel Ocaña y Gabriela López, quienes siempre ha estado conmigo y me han apoyado, que aunque a veces no estemos juntos por nuestras ocupaciones, saben que mi cariño y amistad esta con ustedes. Los quiero mucho.

A mis grandes amigos del Laboratorio de Parasitología Experimental, Aarón Rodríguez, Laura Soto, Christian García, Uriel Martínez y Rocío Ruíz, quienes me han apoyado siempre, han estado conmigo cuando los necesito, son unas excelentes personas. Gracias por todo. Los quiero mucho.

Al personal del Laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, al Dr. Antonio Osuna quien creyó en el proyecto, me adopto durante mi estancia y me apoyo en todo momento. A Mercedes Gómez, Isabel Díaz, Tania Domínguez, Víctor Seco, Karmen Fernández, Ana Karina Ibarrola y María José Luque, quienes me brindaron su cariño y me acogieron en el laboratorio y siempre estaban al pendiente de mí y de mi formación.

A mis compañeros del posgrado, con quienes conviví e hicieron amena mi estadía durante nuestros estudios.

Y a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida, por las experiencias, enseñanzas y conocimiento, y que hicieron posible la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Taxonomía	4
1.2 Historia	4
1.3 Especies	5
1.4 Morfología	7
1.4.1 Trofozoíto	7
1.4.2 Quiste	9
1.5 Epidemiología	12
1.5.1 Epidemiología molecular	14
1.6 Ciclo biológico	15
1.7 Cultivo de <i>G. intestinalis in vitro</i>	17
1.8 Manifestaciones clínicas	18
1.9 Mecanismos patogénicos	19
1.10 Proteínas ricas en cisteína	25
1.10.1 Proteínas de superficie variante específicas (VSPs)	25
1.10.2 Proteínas altamente ricas en cisteína (HCPs)	28
1.10.3 Otras proteínas ricas en cisteína	28
1.11 Gen <i>crp136</i> de <i>G. intestinalis</i>	29
2. JUSTIFICACION	32
3. HIPOTESIS	33
4. OBJETIVO	33
5. MATERIAL Y METODO	34
5.1 Aislados de <i>G. intestinalis</i>	34
5.2 Descongelamiento de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	35
5.3 Criopreservación de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	35
5.4 Obtención de DNA de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	36
5.5 Cuantificación de DNA de los aislados de <i>G. intestinalis</i>	37
5.6 Integridad de DNA de los aislados de <i>G. intestinalis</i>	37

5.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
5.8 Extracción y purificación del DNA de producto de PCR	40
5.9 Secuenciación	41
5.10 Análisis de secuencias	41
6. RESULTADOS	43
6.1 Cultivo <i>in vitro</i> de los aislados de <i>G. intestinalis</i>	43
6.2 Cuantificación y pureza de DNA de los aislados de trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	43
6.3 Integridad de ácidos nucleicos de los trofozoítos de <i>G. intestinalis</i>	44
6.4 Electroforesis de los amplicones de ~900 pb de los aislados de <i>G. intestinalis</i>	46
6.5 Electroforesis de los amplicones de ~220 pb del gen <i>crp136</i> de los aislados de <i>G. intestinalis</i>	47
6.6 Electroforesis de los amplicones de ~220, 340, 460 y 580 del gen <i>crp136</i> de los aislados de <i>G. intestinalis</i>	48
6.7 Cuantificación y pureza de los amplicones de ~900 y ~220 pb para la secuenciación	49
6.8 Secuenciación	51
6.8.1 Alineación del amplicon de ~900 pb de las muestras de <i>G. intestinalis</i>	51
6.8.2 Alineación del amplicon de ~220 pb de las muestras de <i>G. intestinalis</i>	56
7. DISCUSIÓN	60
8. CONCLUSIÓN	70
9. PERSPECTIVAS	71
10. ANEXO	72
11. LITERATURA CITADA	80

Resumen

La giardiasis es una parasitosis cosmopolita, devastadora en la población infantil porque produce diarrea, malabsorción y déficit intelectual. Las evidencias sugieren que la patogénesis en la giardiasis es multifactorial y existen factores atribuibles al huésped y al parásito. La hipótesis de toxinas en *Giardia* ha sido poco explorada y hasta el momento no hay marcadores genéticos de virulencia asociados a toxicidad. Chen y col. en 1995 describieron un gen (*crp136*) en una clona de *Giardia* resistente al metronidazol, que tiene una secuencia similar a una toxina de serpiente (sarafotoxina). Es importante demostrar si los trofozoítos de *Giardia* que proceden de diferentes hospederos presentan esta secuencia. Los trofozoítos de los diferentes aislados se mantuvieron en cultivo TYI-S-33 axénico. Se concentraron y se extrajo el DNA, el cual se purificó y cuantificó. El DNA de todos los aislados se amplificó con los oligonucleótidos T21/Toxin22, se obtuvo un amplicon de ~900, con los oligonucleótidos T21/T120-2 se obtuvieron bandas de ~220, 340, 460 y 580 pb y un amplicon de ~220 pb. Existen al menos 4 copias repetidas en tándem de 120 pb para los aislados WB (cepa de referencia); INP-HGinv, INP-ALAN, INP-RCB (pacientes pediátricos); INP-B45, INP-B47 (bovino) e INP-O3 (ovino); y una sola copia de 120 pb para INP-B2Q1G3 (ovino), por otra parte los aislados INP-EVE e INP-HGinvDT (pacientes pediátricos) no amplificaron para ninguna copia. Los aislados INP-GiA e INP-GiB (gatos) no amplificaron para ningún par de oligonucleótidos, por lo tanto estos aislados al parecer no presentan el gen *crp136*. Este es el primer reporte de la presencia del gen *crp136* en aislados de *G. intestinalis* obtenidos de diferentes hospederos.

Abstract

Giardiasis is a cosmopolitan parasitic disease, devastating in children population that cause diarrhea, malabsorption and intellectual deficit. The evidence suggests that the pathogenesis of giardiasis is multifactorial and there are factors attributable to the host and the parasite. The hypothesis of toxins in *Giardia* has been little explored and so far doesn't exist genetic markers for virulence associated with toxicity. Chen *et al.*, in 1995 they reported a gen (*crp136*) in a clone of *Giardia* resistant to metronidazole, which is similar to a snake toxin (sarafotoxin) sequence. It is important to demonstrate if *Giardia's* trophozoites originating from different host have this sequence. Trophozoites different isolated were maintained in culture TYI-S-33 axenic. They concentrated and DNA was extracted, which was purified and quantified. The DNA of all isolated was amplified with the T21/Toxin22 oligonucleotides, amplicon ~900 bp was obtained; with the T21/T120-2 oligonucleotides were obtained bands of ~220, 340, 460 and 580 bp, and an amplicon ~220 bp was obtained. There are at least 4 copies of 120 bp tandem repeats for isolated WB (reference strain); INP-HGinv, INP-ALAN, INP-RCB (pediatric patients); INP-B45, INP-B47 (cattle); and INP-O3 (sheep), and one copy of 120 bp for INP-B2Q1G3 (sheep), moreover the isolated INP-EVE and INP-HGinvDT (pediatric patients) didn't amplified for any copies. Isolated INP-GiA and GiB (cats) don't amplified for any pair of oligonucleotides, therefore these isolated apparently don't have the *crp136* gene. This is the first report of the presence of *crp136* gene in *G. intestinalis* isolated obtained from different host.

1. Introducción

Giardia intestinalis (sinonimia: *G. lamblia*, *G. duodenalis*) es el protozooario intestinal más frecuente en la población de países en desarrollo y en el 2004 se le incluyó dentro de las enfermedades olvidadas o del rezago (Savioly *et al.* 2006). Los pacientes pueden ser asintomáticos o presentar un cuadro agudo o crónico. Este parásito flagelado produce diarrea y malabsorción de nutrientes que impactan negativamente en el crecimiento y desarrollo de la población infantil (Luján, 2006). A nivel mundial se registran más de 280 millones de pacientes con giardiasis sintomática (Lane y Lloyd, 2002; Geurden *et al.* 2009) y 500,000 casos nuevos por año (WHO, 1996; Thompson, 2008).

G. intestinalis también se encuentra en una gran variedad de mamíferos: animales domésticos (caninos y felinos), de granja (bovinos, caprinos, porcinos, etc.) y animales silvestres (castores, coyotes, primates, roedores, mapaches, etc.) (Ivanov, 2010). Mediante el uso de herramientas moleculares se han descrito 8 ensamblajes o genotipos de *G. intestinalis*, los ensamblajes A (AI y AII) y B son zoonóticos, parasitan humanos y otros mamíferos; los ensamblajes C y D se describieron a partir de trofozoítos obtenidos de perros (Monis *et al.* 1996; Ey *et al.* 1996, Ey *et al.* 1997; Monis *et al.* 1998; Monis *et al.* 1999; Adam, 2001; Van Keulen *et al.* 2002); el ensamblaje E en artiodáctilos (animales de pezuña hendida) (Xiao, 1994); el ensamblaje F en felinos (domésticos); el ensamblaje G en ratas (Meyer, 1985; Thompson y Monis, 2004) y el ensamblaje H en vertebrados marinos: ballenas, focas, delfines y aves marinas (Lasek-Nesselquist *et al.* 2010).

1.1 Taxonomía (Cavalier-Smith, 2003).

Las características de *G. intestinalis* que la ubican en el reino Protozoa están sujetas al Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Los microorganismos del Phylum Metamonada carecen de aparato de Golgi, mitocondrias, hidrogenosomas y peroxisomas. Se ha documentado la presencia de diversas proteínas mitocondriales y mitosomas (estructuras similares a las mitocondrias) (Sogin, 1989; Cavalier-Smith, 2003; Tovar *et al.* 2003). La energía que producen es por glicolisis anaeróbica. Los ribosomas y el rRNA tienen mayor similitud a la de los procariontes (Cavalier-Smith, 1998).

Imperio: Eucariota
Reino: Protozoa
Subreino: Biciliata
Infrareino: Excavata
Phylum: Metamonada
Subphylum: Trichozoa
Superclase: Eopharyngia
Clase: Trepomonadea
Subclase: Diplozoa
Orden: Giardiida
Familia: Giardiidae
Género: *Giardia*
Especie: *Giardia intestinalis*

1.2 Historia

La primera descripción de *Giardia sp.* se atribuye al Holandés Antón Van Leeuwenhoek (1632-1723), quién la encontró en una muestra de sus propias heces diarreicas, pero fue hasta 1859 que el médico checo Vilem Lambl (1824-1895) realizó con gran detalle una completa caracterización del parásito y lo llamó *Cercomonas intestinalis*.

Kunstler (1882) le dio el nombre de *Giardia*. Blanchard (1888) propuso la nomenclatura *Lamblia intestinalis* y Stiles (1902) la denominó *Giardia duodenalis*. Kofoid (1915) propuso el nombre de *Giardia lamblia* (Campos *et al.* 1999; Faubert, 2000; Adam, 2001).

Grassi (1879) describió la fase quística de este protozoo. A partir de 1970 se aceptó ampliamente el nombre de *Giardia lamblia* en muestras procedentes de humanos (Faubert, 2000; Adam, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) acepta el género y especie de *Giardia intestinalis* (sin. *G. lamblia* o *G. duodenalis*) (Boreham *et al.* 1990; Van Keulen, 2002).

1.3 Especies

Se han descrito varias especies con base a la morfología del trofozoíto y del cuerpo medio. Filice (1952), describió tres especies: *G. intestinalis* que infecta a una amplia variedad de mamíferos, entre ellos el hombre. Los trofozoítos son piriformes y los cuerpos medios con forma de uña de martillo; *G. muris* en roedores y aves, los trofozoítos son más redondos que largos y los cuerpos medios son pequeños y redondos; y *G. agilis* en anfibios, los trofozoítos son alargados y los cuerpos medios tienen forma de lágrima (Meyer, 1985) (Fig.1).

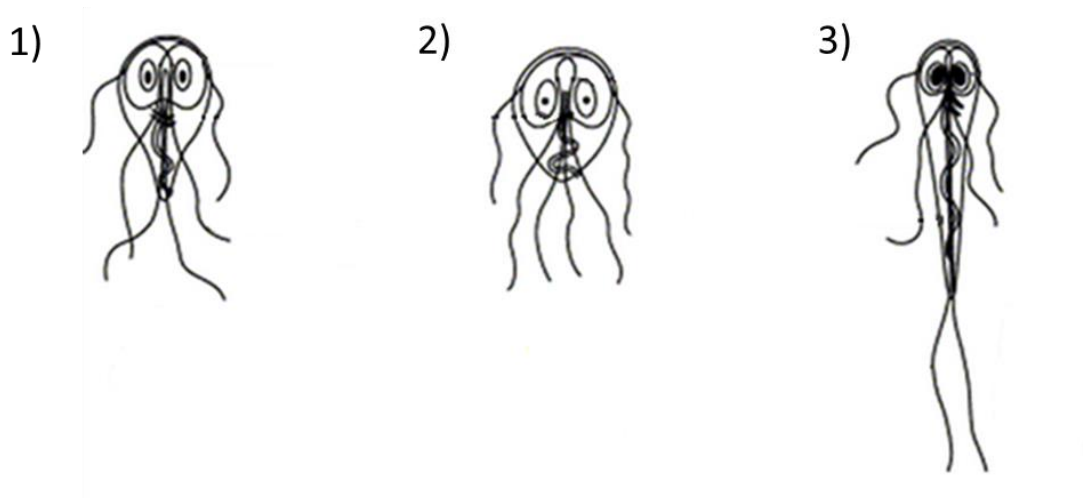


Figura 1. Morfología de los trofozoítos de las tres especies de *Giardia*. 1) *G. intestinalis* 2) *G. muris* y 3) *G. agilis*. Filice (1952).

Posteriormente se describieron dos especies en aves, *G. ardeae* que se caracteriza porque tiene un flagelo caudal y *G. psittaci* que carece de flanco ventrolateral. Adicionalmente, la especie *G. microti*, que se encuentra en roedores, se caracteriza por poseer 2 trofozoítos en el quiste los cuales son completamente maduros y el disco ventral totalmente diferenciado (Tabla 1) (Van Keulen *et al.* 1998; Adam, 2001; Thompson y Monis, 2004).

Tabla 1. Especies de *Giardia* y sus hospederos

Especies de <i>Giardia</i>	Cuerpo medio	Huéspedes
<i>G. intestinalis</i>	En forma de uña de martillo	Humanos y otros mamíferos
<i>G. muris</i>	Pequeños y redondos	Roedores
<i>G. agilis</i>	En forma de lágrima	Anfibios
<i>G. ardeae</i>	En forma de uña de martillo	Aves
<i>G. psittaci</i>	En forma de uña de martillo	Aves
<i>G. microti</i>	En forma de uña de martillo	Ratones

1.4 Morfología

G. intestinalis tiene dos estadios durante su ciclo de vida: el trofozoíto el cual produce las manifestaciones clínicas y el quiste que es la estructura de resistencia y forma infectante (Adam, 2001) (Fig. 2).

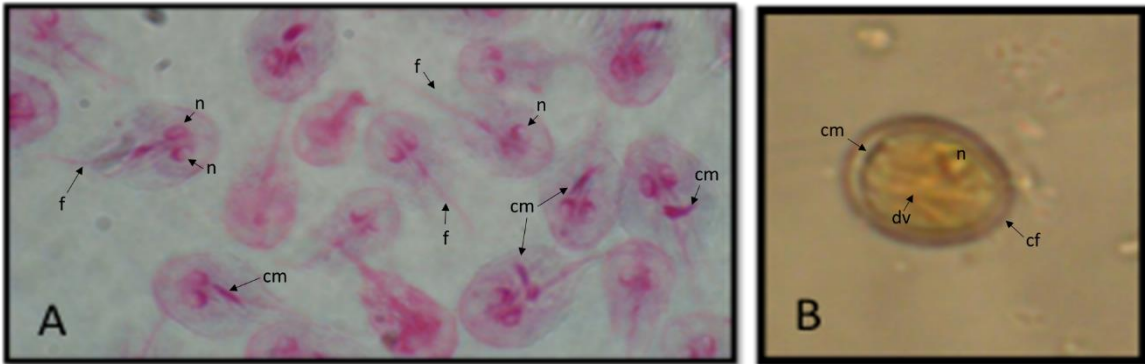


Figura 2. Imágenes de microscopia de luz que muestran trofozoítos teñidos con Giemsa, (A) se observan los núcleos (n), cuerpos medios (cm) y flagelos (f), y (B) un quiste teñido con lugol, se observa núcleos (n), fragmentos del disco ventral (dv), capa membranosa interna (cm) y capa filamentosa externa (cf). Fotos donadas por Gustavo Peralta.

1.4.1 Trofozoíto

El trofozoíto es piriforme, mide entre 12 a 15 μm de longitud, 5 a 9 μm de ancho y 1 a 2 μm de espesor, es aplanado dorso-ventralmente, tiene dos núcleos, cuerpos basales, cuatro pares de flagelos, cuerpo medio, vacuolas periféricas y un disco ventral (Adam, 2001) (Fig. 3).

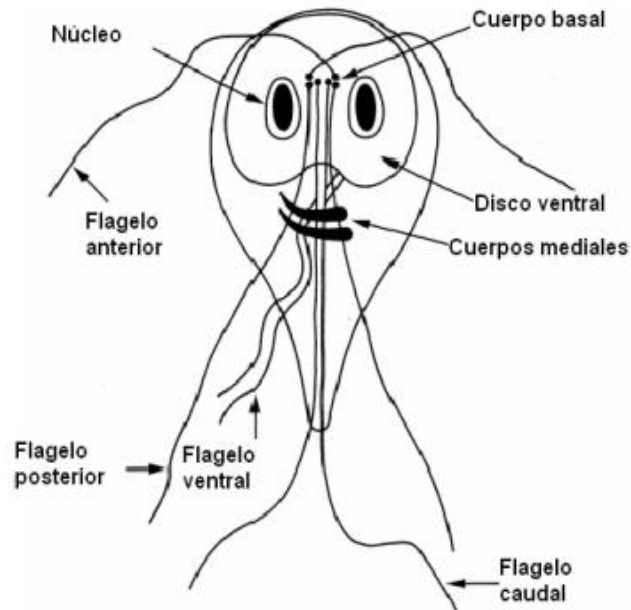


Figura 3. Trofozoito de *G. intestinalis*. Faubert (2000).

Los núcleos son ovoides situados simétricamente, y ambos núcleos poseen aproximadamente la misma cantidad de DNA (Adam, 2001). El nucléolo mide 0.2 a 0.3 μm y se ubica en la zona anterior de cada núcleo (Jiménez-García *et al.*, 2008), éste fue descrito por primera vez por biólogos de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El disco ventral es cóncavo y ligeramente asimétrico, se localiza en la región anteroventral del trofozoito y se encuentra implicado en la adherencia al epitelio intestinal. Las proteínas constituyentes de este disco son giardinas (un grupo de proteínas de conformación alfa hélice y pesos moleculares entre 29 a 38 kDa), proteínas contráctiles como actina, miosina y tropomiosina que constituyen la base bioquímica para la contracción y adherencia, y tubulinas que forman los microtúbulos del disco ventral y de los flagelos.

Tienen cuatro pares de flagelos que se originan de cuerpos basales en la región ventral del trofozoíto. Se han reportado la presencia de mitosomas, pequeños organelos con doble membrana y sin DNA, cuya función está relacionada con la maduración de proteínas ferro-sulfúricas (Adam, 2001).

Basado en estudios morfológicos y de proteínas marcadas se han documentado tres tipos de compartimientos membranosos: a) el correspondiente al retículo endoplásmico, el cual se extiende bilateralmente a través de toda la célula y se continúa con la membrana nuclear, b) el sistema de vesículas periféricas con actividad lisosomal y endosómica y c) las vesículas secretoras específicas de enquistamiento que contienen proteínas, proteoglicanos y lipopolisácaridos, destinados a la formación de la pared quística (Hehl y Marti, 2004; Bazán-Tejeda *et al.* 2008).

1.4.2 Quiste

El quiste es ovoide, mide entre 8 y 12 μm de longitud, 7 a 10 μm de ancho y el espesor es de 0.3 a 0.5 μm . Dentro de los quistes se observan los axonemas, láminas de microtúbulos, ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral; los núcleos se localizan en un extremo del quiste y cada quiste maduro es tetranucleado. La actividad metabólica de los quistes es solo del 10-20% de la desarrollada por los trofozoítos (Adam, 2001) (Fig. 4).

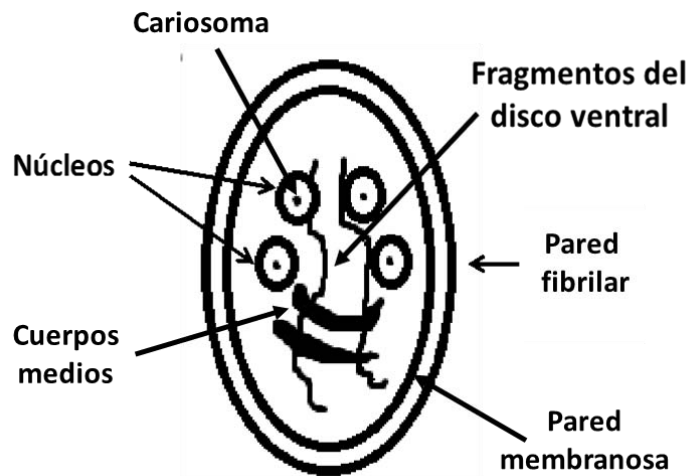


Figura 4. Quiste de *G. intestinalis*.

El análisis bioquímico de la pared del quiste ha demostrado que está integrada por una porción interna membranosa y una externa filamentosa de 0.3-0.5 μm (Erlandensen *et al.*, 1989). La pared filamentosa externa está compuesta de proteínas (37%) y de filamentos del carbohidratos (63%), principalmente del homopolímero N-acetil galactosamina (NAcGal) (Jarroll *et al.*, 1989; Manning *et al.*, 1992; Adam, 2001). El precursor de este homopolímero es la UDP-N-acetilgalactosamina (UDP GlcNAc), la cual se sintetiza a partir de glucosa por una vía de enzimas que se sobre-expresan durante el enquistamiento (López *et al.*, 2007).

Se han identificado hasta el momento tres proteínas CWPs (cyst wall protein) las cuales se han caracterizado funcional y bioquímicamente (Faubert, 2000). Las CWPs se diferencian entre sí debido a que CWP2 tiene un dominio carboxilo terminal de 121 aminoácidos y CWP3 presenta solo 4 repetidos ricos en leucina

(LRRs), mientras que CWP1 y CWP2 tienen 5 (Luján *et al.*, 1995). Durante la fase temprana de enquistamiento estas proteínas se unen entre sí mediante sus LRRs formando un heterocomplejo estable se localizan dentro de vesículas secretoras específicas (ESV), para luego incorporarse a la pared de los trofozoítos enquistantes (Erlandsen *et al.*, 1996; Argüello-García *et al.*, 2002). Mediante estudios de microscopía electrónica se ha reportado la aparición de las ESVs desde las 6 h post-inducción de enquistamiento con una apariencia electrón-densa y se determinó que estas vesículas surgen del retículo endoplásmico (Lanfredi-Rangel *et al.*, 2003), mientras que la identificación de N-acetil galactosamina sobre la superficie de trofozoítos enquistantes se observó hasta las 9-10 h post-inducción (Argüello-García *et al.*, 2002).

Durante la fase tardía, las CWPs incrementan su expresión inmediatamente al igual que otras proteínas como la glucosamina-6-fosfato isomerasa (GLN6PIb), la proteína BiP, Myb2, GLP1 y ENC6 (Que *et al.*, 1996; Knodler *et al.*, 1999). Las CWPs son transportados por las ESVs a la periferia celular y se depositan inicialmente en la superficie del trofozoíto, mientras que los precursores de N-acetil galactosamina se integran posteriormente a la pared del quiste para finalmente copolimerizarse y formar la malla fibrilar. En conjunto la unión de todas estas proteínas le confiere flexibilidad y estabilidad a la pared, permitiendo la deformación del quiste y el movimiento de los trofozoítos en su interior (Luján *et al.* 1995).

1.5 Epidemiología

La giardiosis es aún una parasitosis re-emergente (Thompson, 2000) y desde 2004 fue incluida dentro de las “enfermedades olvidadas” (Savioly *et al.*, 2006). La OMS ha informado que en América, Asia y África hay 280 millones de personas con giardiosis sintomática y 500,000 personas se infectan anualmente (WHO, 1996; Lane y Lloyd, 2002). En los países desarrollados la prevalencia es de 2 a 5% (Issac-Renton *et al.*, 1993; Ortega y Adam, 1997) y en los países en desarrollo está entre 20 y 69% (Gilman *et al.*, 1988). En algunos de estos países, la giardiosis en niños afecta casi al 100% de la población (Luján, 2006). En México se documentó una frecuencia de 7.4 a 68.5% y en el 2009 se registraron 18 831 casos (Tay *et al.*, 1994; Cifuentes *et al.*, 2000; Boletín Epidemiología, 2011) y la seroprevalencia es de 55.3% (Cedillo-Rivera *et al.*, 2009). La periodicidad de parasitosis es muy variable con cifras que fluctúan entre 2 y 39% con una distribución por grupos de edad de 22% en recién nacidos, 30% preescolares y 20% en escolares. Las publicaciones en México de los últimos 4 años informan prevalencias de giardiasis desde 14.9% en el estado de Puebla, hasta 70% en zonas suburbanas del Distrito Federal (Boletín Epidemiología, 2011). Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, en los países subdesarrollados es mayor la prevalencia que en los países desarrollados.

El mecanismo de infección es el fecalismo y la trasmisión fundamentalmente es por vía hídrica, porque los cuerpos de agua se contaminan con heces humanas o de animales (Marshall *et al.*, 1997). En estancias infantiles la infección es fecal-oral directa (Polis *et al.*, 1986); los niños que no controlan esfínteres o que se

introducen en las piscinas pueden ser diseminadores de quistes (Hoque *et al.*, 2001; Linane *et al.*, 2001). Otras vías importantes son los manipuladores de alimentos, los transmisores mecánicos (*Musca domestica* y *Periplaneta americana*) y la transmisión sexual en homosexuales (Hill, 1993; Luján, 2006).

Esta parasitosis afecta de modo preferencial a la población infantil. Es común en pacientes hipogammaglobulinémicos y turistas cuando viajan a países endémicos (Lo Galbo *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1988; Hill, 1993; Marshall *et al.*, 1997). Además de infectar humanos, *G. intestinalis*, también infecta a animales domésticos y silvestres (Meloni *et al.*, 1993; Xiao y Herd, 1994; Van Keulen *et al.*, 2002; Appelbee *et al.*, 2003; Thompson, 2004).

Debido a que los trofozoítos y quistes obtenidos de diferentes hospederos mamíferos son morfológicamente indistinguibles, se han utilizado herramientas bioquímicas y de biología molecular para poderlos discriminar: análisis de antígenos de secreción y excreción de *G. intestinalis* (Nash *et al.*, 1985a), isoenzimas como la fosfoglucomutasa (Meloni *et al.*, 1988; Cedillo *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1989; Homan *et al.*, 1992; Moss *et al.*, 1992; Mayrhofer *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2003), enzimas de restricción, hibridación (Nash *et al.*, 1985b; Homan *et al.*, 1992), cariotipos (Korman *et al.*, 1992), huella génica (Carnaby *et al.*, 1994; Hopkins *et al.*, 1999), PCR-RFLP's (gen de beta giardina (*bg*) y de glutamato deshidrogenasa (*gdh*), triosafosfato isomerasa (*tpi*), factor de elongación 1 alfa (*ef1α*), SSU-rRNA) (Ey *et al.*, 1992; Ey *et al.*, 1993a; Ey *et al.*,

1993b; Ponce–Macotela *et al.*, 2002; Cedillo-Rivera, 2003; Read *et al.*, 2004) y secuenciación (Monis *et al.*, 1999).

1.5.1 Epidemiología molecular.

Un aspecto importante del uso de la biología molecular es el poder establecer patrones epidemiológicos precisos. La epidemiología molecular ha ejercido un impacto enorme sobre la taxonomía de *Giardia*. Métodos basados en la caracterización de trofozoítos (hibridación de ácidos nucleicos, análisis de patrones de banda cromosomales, PCR y secuenciación, entre otros) han permitido profundizar en el conocimiento de la distribución de los genotipos en diferentes áreas geográficas e iniciar la asociación entre los genotipos y el cuadro clínico con el fin de establecer marcadores de infectividad, toxicidad y virulencia; además permiten una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos (Adam, 2001; Kohli *et al.*, 2008; Al-Mohammed, 2011; Lebbad *et al.*, 2011).

Amplificación del DNA de trofozoítos

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es una técnica que fue desarrollada por Kary B. Mullis (Mullis *et al.*, 1986), mediante la cual se hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de DNA sin tener que clonarlo (Barrera *et al.*, 1993).

Se han reportado numerosos trabajos a partir de la extracción de DNA de trofozoítos para la amplificación de genes completos (como los que codifican para el gen *tpi*, *gdh*, etc.) que codifican a enzimas y permiten la determinación del

genotipo infectante (Monis *et al.*, 1999; Bonhomme *et al.*, 2011; Sulaiman *et al.*, 2003), secuencias específicas de interés (fragmentos de tamaño específicos obtenidos a partir de enzimas de restricción) donde se han reportado perfiles de bandas para diagnóstico de los genotipos de *Giardia* (Goñi *et al.*, 2010; Otero-Negrete *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2014) entre otros, que han demostrado gran especificidad para la caracterización del parásito.

Secuenciación y alineamiento de DNA de trofozoítos de *G. intestinalis*

La secuenciación de DNA tiene como finalidad determinar el orden los nucleótidos (A, C, G y T) en una cadena de DNA. Algunos de los genes que han sido secuenciados son el de la subunidad 18S rRNA (SSU-rRNA), *gdh*, *tpi*, *bg*; los cuales permiten discriminar con base a la secuencia de los nucleótidos el genotipo de *G. intestinalis* (Alcaraz, 2002; Bertrand *et al.*, 2005). Existen también reportes sobre el alineamiento de secuencias génicas entre aislados (WB y GS) zoonóticos, estos resultados suelen ser usados para identificar características genéticas únicas o compartidas (Frazén *et al.*, 2009).

1.6 Ciclo biológico

G. intestinalis tiene un ciclo de vida directo. El mecanismo de infección es por fecalismo fundamentalmente por vía hídrica. Cuando los quistes son ingeridos pasan por el pH ácido del estómago y pH alcalino del duodeno; el primer signo de actividad es el movimiento flagelar y los trofozoítos eclosionan del quiste (Bingham y Meyer, 1979; Feely *et al.* 1991; Faubert, 2000).

El proceso de desenquistamiento es rápido, entre 5 y 10 minutos, y los trofozoítos se dividen asexualmente por fisión binaria longitudinal después de salir del quiste y en ocasiones antes de terminar su salida, este proceso tiene una duración que varía entre 6 y 20 horas (Feely *et al.*, 1990). Las sales biliares y el colesterol favorecen su crecimiento poblacional, lo que promueve la colonización del duodeno y yeyuno. El mecanismo por el cual los trofozoítos se diferencian en quistes se denomina enquistamiento, consiste en una serie de eventos coordinados con cambios morfológicos (desmantelamiento del citoesqueleto y del disco ventral, retracción de los flagelos en los axonemas, formación de ESVs y exportación a las superficie del trofozoíto, empaquetamiento de los organelos) y bioquímicos (activación génica para la expresión de las proteínas de pared de quiste (CWP1, CWP2, CWP3, etc.), síntesis de la N-acetil-galactosamina en la pared del quiste) (Luján *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2002).

El enquistamiento se inicia debido a la carencia de colesterol en la membrana citoplasmática, se activa la expresión de genes codificadores de las proteínas del enquistamiento (CWP1 y CWP2). Cuando los quistes se excretan junto con las heces ya son infectantes (Thompson *et al.*, 1993; Luján *et al.*, 1997; Mowatt *et al.*, 1995). El enquistamiento es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedero y para su dispersión (Midlej y Benchimol, 2009; Luján, 2006) (Fig. 5).

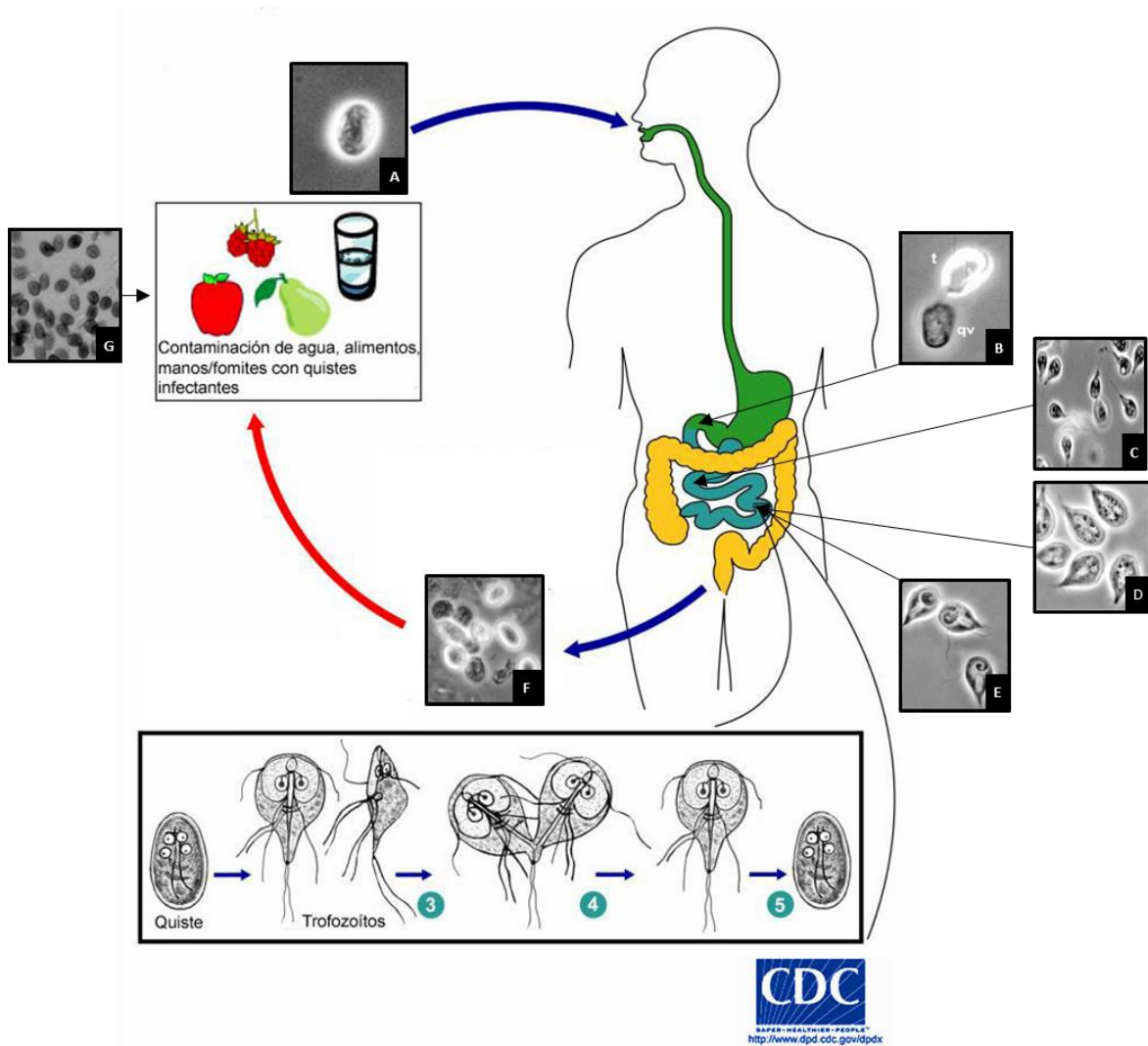


Figura 5. Ciclo biológico de *G. intestinalis*. A) Quistes son ingeridos en los alimentos. B) Quiste activado por pH ácido (estómago) y pH alcalino (duodeno), y el trofozoito eclosiona del quiste (quiste vacío (qv) y trofozoito (t)). C) Trofozoito en división e inicio de la colonización. D) Trofozoitos llenos de vesículas en proceso de enquistamiento y reacomodo del disco ventral. F) Quiste maduro son eliminados junto con las heces y depositados en el ambiente. www.cdc.gov. Imágenes proporcionadas por la Dra. Martha Ponce Macotella, INP.

1.7 Cultivo de *G. intestinalis* *in vitro*

Karapetyan (1962), fue el primero en cultivar trofozoitos *in vitro*, para el cual usó un medio de cultivo monoxénico que contenía suero inactivado, digerido de carne,

extracto de embrión y levaduras de *Sacharomyces cerevisiae*. Posteriormente se demostró que el medio de cultivo TYI-S-33 para crecer trofozoítos de *Entamoeba* (Diamond *et al.*, 1978) complementado con bilis bovina favorecía el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia* (Keister, 1983).

1.8 Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación de la giardiasis es de 12 a 19 días y el de la infección dura desde algunas semanas hasta varios meses, incluso años (Chester *et al.*, 1985; Hill, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Lengerich *et al.*, 1994; Faubert, 2000). Esta parasitosis puede ser asintomática, y estos pacientes pueden presentar malabsorción intestinal y eliminación de quistes (Astiazarán-García *et al.*, 2000). Cuando es sintomática puede presentar fase aguda y crónica. En la giardiosis aguda puede haber dolor abdominal, diarrea, hiporexia, meteorismo, náuseas, flatulencias, estreñimiento, vómito, bajo peso, palidez de tegumentos, borborigmos y talla baja (Kamath *et al.*, 1974; Eckmann, 2003). El dolor abdominal es epigástrico y posprandial, las evacuaciones son explosivas, profusas, acuosas al principio y después esteatorreicas y fétidas. Debido a que algunas manifestaciones clínicas de esta fase son semejantes a las provocadas por virus (rotavirus), bacterias (*Campylobacter*, *Escherichia coli* toxígenica) y otros parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium sp*), es necesario realizar un diagnóstico diferencial y considerar el periodo de incubación, el tiempo prolongado de los síntomas, y la ausencia de fiebre y sangre en heces (Hill, 1993).

La giardiosis crónica puede durar varios meses y afecta de forma importante a la población infantil; el dolor abdominal se exacerba durante la ingestión de los alimentos y los niños dejan de comer, presentan meteorismo, distensión abdominal, flatulencia fétida, malestar general, astenia, adinamia, pérdida de peso, talla baja y déficit cognitivo. Las evacuaciones son blandas, esteatorreicas y fétidas. Este cuadro puede alternarse con periodos de estreñimiento o evacuaciones de consistencia normal. Durante esta fase, los pacientes pueden desarrollar malabsorción de vitaminas A y B12, micronutrientes como hierro y zinc, proteínas, lípidos y carbohidratos, sobre todo lactosa, sacarosa, maltosa e isomaltosa (Astiazarán-García *et al.*, 2000).

Los pacientes con malabsorción de lactosa pueden mostrar intolerancia a la leche, por lo que se les recomienda no ingerir productos lácteos durante los primeros 30 días después del tratamiento. El diagnóstico diferencial se establece con enfermedad celiaca, sprue, enteritis tropical, úlcera duodenal, hernia hiatal, infecciones con *Cryptosporidium sp*, *Isospora belli* y *Strogyloides stercoralis* (Hill, 1993; Thompson *et al.*, 1993).

1.9 Mecanismos patogénicos.

Traumático

Los trofozoítos se adhieren a los enterocitos por la presión negativa que produce el disco ventral, generada por la fuerza hidrodinámica secundaria a la actividad constante de los flagelos ventrales, este mecanismo también explica la adherencia de los trofozoítos al vidrio cuando crecen en cultivos *in vitro*. En la adherencia

mediada por factores bioquímicos como las lectinas (tienen dos o más sitios específicos de reconocimiento de azúcares) de unión a glicoproteínas, participan también las proteínas contráctiles del disco ventral: giardinas, actina, miosina, tropomiosina y vinculina (Feely *et al.*, 1982; Narcisi *et al.*, 1994). Las lectinas son proteínas que están relacionadas con la adherencia mediante receptores específicos a carbohidratos (N-acetilgalactosamina) localizados en las superficies celulares de las glicoproteínas en la superficie del trofozoíto. La interacción de las lectinas con el epitelio intestinal produce exfoliación, lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades. Los trofozoítos de *G. intestinalis* poseen una lectina (taglina) de 28 a 30 kDa que se une a un receptor de membrana que contiene residuos de manosa-6-fosfato, D-manosa y D-glucosa que puede inducir alteraciones del epitelio intestinal (Farthing *et al.*, 1986; Buret, 2007; Troeger *et al.*, 2007).

Enzimático

Enzimas como las sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasa, proteasas de cisteína y tiolproteasas (catepsina B) favorecen la adherencia del parásito al epitelio intestinal debido a que afectan las glicoproteínas de los enterocitos y alteran la integridad de las microvellosidades (Feely y Dyer, 1987; Hare *et al.*, 1989; Parenti, 1989; Farthing, 1997).

Barrera mecánica

Por la extensa superficie de absorción de las microvellosidades es difícil pensar en la formación de una barrera mecánica por parte de los trofozoítos que impida la

absorción de los nutrientes; sin embargo, la adherencia de los trofozoítos por el disco ventral al vidrio cuando crecen en cultivos *in vitro* y la formación de monocapa, sugiere que algunas zonas del epitelio intestinal podrían estar recubiertas de trofozoítos siguiendo este patrón, causando daño a las microvellosidades y lo que provoca distintos grados de malabsorción intestinal (Chávez *et al.*, 1995; Katelaris *et al.*, 1995; Deselliers *et al.*, 1997; Astiazarán-García *et al.*, 2000; Buret, 2007).

Ruptura de uniones celulares

Existen proteínas implicadas en las uniones celulares del epitelio intestinal denominadas zonula-occludens (ZO-1), cingulina, ocludina y claudinas. La ZO-1 es una proteína de membrana periférica que interacciona en la unión de la claudina con la F-actina del citoesqueleto. La función de la ZO-1 entre las uniones celulares y el citoesqueleto es muy importante para la regulación de permeabilidad paracelular. Se ha visto que los trofozoítos de *G. intestinalis* desorganizan las uniones celulares a nivel ZO-1 e incrementan la permeabilidad transepitelial (Buret *et al.*, 2002; Buret, 2007; Troeger *et al.*, 2007).

Apoptosis

Se ha propuesto que la apoptosis puede ser otra causa de aumento de la permeabilidad intestinal. Además se ha establecido que la muerte celular por apoptosis no desarrolla inflamación. Recientemente se demostró que *Giardia* produce apoptosis en enterocitos dependientes de caspasa-3. Este tipo de muerte celular se ha correlacionado con la ruptura de uniones celulares a nivel de la ZO-1

e incremento de la permeabilidad epitelial; además, el efecto proapoptótico de *G. intestinalis* podría explicar la carencia de infiltrado inflamatorio en tejido intestinal colonizado por este parásito (Chin *et al.*, 2002; Buret, 2007; Troeger *et al.*, 2007). La maquinaria celular y las proteínas marcadoras involucradas en este proceso no se han identificado (Hernández *et al.*, 2012).

Competencia por nutrientes con el huésped

Los trofozoítos compiten con el huésped por sales biliares, nucleótidos, aminoácidos y micronutrientes como hierro y zinc, porque no los pueden sintetizar *de novo*. La disminución de sales biliares en el intestino altera la formación de micelas y se produce una malabsorción de las grasas y esteatorrea (eliminación de grasas en materia fecal). Para la producción de energía, además de la glucosa utiliza aspartato, alanina y arginina. La cisteína es un aminoácido fundamental de las proteínas variables de superficie, que forman enlaces disulfuro que le dan alta resistencia a los trofozoítos (Nash y Mowatt, 1993; Eckmann *et al.*, 2000; Eckmann y Gillin, 2001).

Todos estos mecanismos contribuyen a la atrofia de microvellosidades y al daño epitelial que resulta en malabsorción intestinal. Por otra parte el recambio acelerado de los enterocitos inmaduros tiene como consecuencia la producción de enzimas defectuosas o disminuidas como la glucoamilasa, isomaltasa y ATP-asa basolateral de la bomba Na^+/K^+ . También se encuentran atenuadas las enzimas celulares: isocitrato deshidrogenasa (provoca menor producción de ATP, la falta de energía en las células da lugar a la disminución de la absorción intestinal de

carbohidratos y aminoácidos) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (altera la biosíntesis de lípidos y otras macromoléculas que son necesarias para la integración de las membranas celulares) (Belosevic *et al.*, 1989; Nain *et al.*, 1991; Farthing, 1997).

Tóxico

No se ha logrado identificar toxina alguna, pero se ha observado que el medio de cultivo, en donde se han crecido trofozoítos, causa alteraciones en el epitelio intestinal. A finales del siglo pasado se describió el gen de una proteína variable de superficie (CRP136) que contiene secuencias repetidas que codifican un péptido de 21 a 23 aminoácidos y un bajo peso molecular que tiene similitud de 57% con una sarafotoxina (Chen *et al.*, 1995).

Las sarafotoxinas (Stx) son polipéptidos de 21 a 24 aminoácidos y poseen una secuencia CXCX₇CXXC, tienen actividad vasoconstrictora y se encuentran en el veneno de la víbora *Atractaspis enggadensis*, el envenenamiento por la mordedura de esta serpiente ocasiona síntomas semejantes a los observados en la giardiosis; como dolor abdominal, diarrea, entre otros (Ducancel *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Upcroft *et al.*, 1997; Upcroft y Upcroft, 1998; Ducancel, 2002).

Existe un grado de similitud del 57% a nivel de nucleótidos y 34% a nivel de aminoácidos en el gen de la sarafotoxina y el gen que codifica a la proteína CRP136 (Chen *et al.*, 1995) (Fig. 6).

NUCLEOTÍDOS

```

A) CRP136  88  ACTGACACGAAGCAGTGCACCAAGGACCCAGAAGCGCCGTGCAACGTCGAGGGCTGTGAGAC 147
      |  ||| ||| ||| ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SRTX-e  433  AGAGACACGAAGCAGGCCGCGAGAGACCCCTCGCCGCGAGCGCAACGTCGAGGCCACTTTGCAC 495

      148  CTGCGTGGAGGGCAACGCCAGCAGTGC...AAGACGTGCCGTCCGGGCTACACCATCAAC 207
      |||  ||  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      496  CTGTAAGACATGACGGATAAAGAGTGCCTCTATTTCTGCCATCAGGGC...ATCATCTGG 533
  
```

AMINOÁCIDOS

```

B) CRP136  40  TDTKQCTKDPEAPCNVEGCETCVEGNAQQCK-TCRPGYTIN 79
      ||||...|||. |||. || : ...:| |:|. |.
SRTX-e  91  RDTKQAARDPSPQRNVEPLCTCKDMDKELYFCHQG-IIW 130
  
```

Figura 6. Comparación entre una unidad repetida de 120 pb del gen *crp136* de *G. intestinalis* y un precursor del gen de la sarafotoxina. A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos entre la sarafotoxina y *crp136* de *G. intestinalis*, y B) alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre la sarafotoxina y *crp136* de *G. intestinalis*. Chen *et al.*, 1995.

Existe una estrecha relación entre las sarafotoxinas y las endotelinas, por su actividad vasoconstrictora (Yanagisawa *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989; Ducancel, 2002) y participar en la contracción del músculo liso intestinal, incluyendo una similitud entre sus secuencias del 60% (de Nucci *et al.*, 1988). Las endotelinas son un grupo de preproendotelinas dentro de los 21-residuos de endotelina madura similar a la sarafotoxina y otras pequeñas toxinas ricas en cisteína (toxina α -escorpión) (Yanagisawa *et al.*, 1988); sin embargo es importante resaltar que no existe similitud entre las endotelinas y el gen *crp136* de *G. intestinalis* (Chen *et al.*, 1995).

1.10 Proteínas ricas en cisteína.

Existe una gran familia de multigenes de alta similaridad que incluyen a los genes que codifican a proteínas variables de superficie (VSPs), proteínas altamente ricas en cisteína (HCPs), cinasas NEK y proteínas 21.1, las cuales protegen a los trofozoítos de proteasas (Nash, 2002).

1.10.1 Proteínas de superficie variante específicas (VSPs)

Los trofozoítos sobreviven al ambiente de las enzimas digestivas y bilis del hospedero, debido a que tiene una pared densa de proteínas de superficie variante específicas o VSPs, que cubren la membrana y la protegen (Nash *et al.*, 2001). Las VSP varían en secuencia y tamaño, todas son ricas en cisteína (cerca del 12%) con frecuentes motivos CXXC. Cada una tiene un péptido señal amino terminal de 14 a 17 aminoácidos altamente variable (así cada proteína es antigénicamente diferente), una región carboxilo terminal característica de 38 aminoácidos que incluye una región transmembranal que presenta 5 aminoácidos CRGKA y una señal de poliadenilación extendida (Fig.7), sin embargo, la secuencia génica es diferente permitiendo exponer diferentes antígenos al hospedero (Gillin *et al.*, 1990; Mowatt *et al.*, 1994; Eckmann y Gillin, 2001; Barry *et al.*, 2003; Ankarklev *et al.*, 2010).

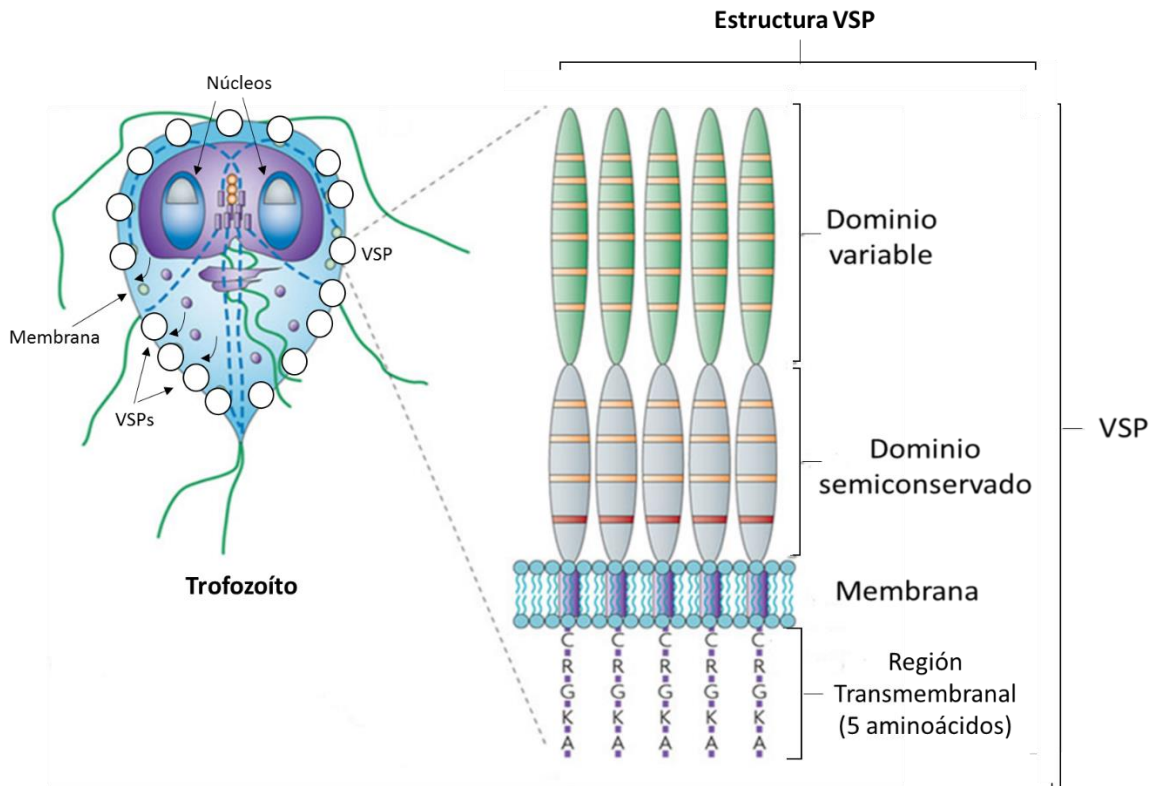


Figura 7. Características estructurales de las proteínas variables de superficie (VSP) de *G. intestinalis*. Tomado de Ankarklev *et al.*, 2010.

Se estima que el repertorio de VSPs es de 235 a 275 genes. Las VSP frecuentemente se agrupan de 2 a 9 genes con orientación continua de inicio a fin, incluso el extremo 5' de una VSP se sobrelapa con el 3' de una segunda VSP (Morrison *et al.*, 2007).

Cada trofozoíto expresa solo una proteína de superficie de aproximadamente 150 proteínas que existen en el genoma de *Giardia* y posteriormente cambian hacia una proteína variable de superficie para proteger al trofozoíto del sistema inmune y microambiental del intestino (Nash *et al.*, 2001; Davids *et al.*, 2006; Ropolo *et al.*,

2005). Esto se ha observado mediante la clonación de algunas VSPs de trofozoítos individuales y la presencia de nuevas VSPs cada 6 a 13 generaciones (Nash *et al.*, 1990; Singer *et al.*, 2001). La expresión de una VSP puede cambiar a la expresión de otra VSP sin un orden preestablecido y la frecuencia depende del aislado (Nash, 2002).

La regulación de la expresión de las VSP implica un sistema que comprende las proteínas RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), Dicer y Argonauta (Giardia AGO), componentes de la maquinaria de RNA de interferencia (iRNA). Los dsRNAs son procesados a fragmentos de siRNAs de 20 a 30 nucleótidos por Dicer. Los siRNAs suprimen la expresión de los genes VSP mediante el corte del mRNA complementario en dos mitades, a través de la interacción de la hebra antisentido del siRNA con el complejo Dicer/Giardia AGO. Las dos mitades del mRNA son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, lo que conlleva la supresión de la expresión del gen. La función de RdRP, Dicer y AGO es necesaria para restringir la expresión de un solo gen de VSP a la vez y que la inhibición de estas enzimas permitiría la expresión de varias VSP al mismo tiempo en un trofozoíto (Ullu *et al.*, 2004; Ullu *et al.*, 2005; Prucca *et al.*, 2008; Ankarlev *et al.*, 2010).

Menos de la mitad de los genes VSP(41%) tienen un elemento iniciador (INR) que es una región rica en AT, la cual no es conservada debido a la longitud y posición exacta con respecto al inicio de la transcripción (Sun y Tai, 1999; Yee *et al.*, 2000; Davis y Nash, 2002) y cuya función es la de ser un promotor, además se cree que

el INR puede tener también una posible función bidireccional durante la transcripción (Teodorovic *et al.*, 2007).

1.10.2 Proteínas altamente ricas en cisteína (HCPs)

Hay otras proteínas con cisteína, las HCPs, dentro de las cuales destacan los genes de 61 proteínas con 10% más de cisteína y 20 proteínas con más motivos CXXC o CXC, comparados con las proteínas variables de superficie (VSPs). Las regiones codificantes de las HCP comprenden el 3% del genoma total de *Giardia*. Estas proteínas carecen de la terminación CRGKA la cual es característica de las VSP y tienen una región que abarca un dominio divergente de las VSPs (Davids *et al.*, 2006).

1.10.3 Otras proteínas ricas en cisteína

Se han determinado otras similitudes del gen *crp136* con otros genes que codifican a proteínas ricas en cisteína pero con un menor nivel de significancia comparado con las sarafotoxinas. Estas proteínas ricas en cisteína corresponden a la familia de receptores de EGF (factor de crecimiento epidérmico), TNF (factor de necrosis tumoral), NGF (factor de crecimiento de tejido nervioso), LDL (lipoproteínas de baja densidad), la familia de factores de coagulación, metalotioneínas, un precursor de una glicoproteína (GP46/M-2) de *Leishmania amazonensis* (Lohman *et al.*, 1990) y una glicoproteína de *Entamoeba histolytica*. También existen regiones que no son repetidas y que tienen similitudes de entre un 20 y 30% con otros genes *crp* de *Giardia* como la fosfolipasa A2 y la ω -agatoxina de araña (Chen *et al.*, 1995; Yang y Adam, 1995).

1.11 Gen *crp136* de *G. intestinalis*

G. intestinalis tiene aproximadamente 12 millones de pares de bases (Fan *et al.*, 1991) distribuidos en 5 cromosomas; sin embargo, el número de cromosomas varía drásticamente en tamaño entre los diferentes aislados de los genotipos descritos (Upcroft y Upcroft, 1993). El gen *crp136* no presenta intrones y los espacios intergénicos van desde cero hasta unos pocos de cientos de pares de bases (Upcroft *et al.*, 1990; Adam, 1991; Chen *et al.*, 1995; Knodler *et al.*, 1999).

El gen *crp136* se localiza en la región subtelomérica de los cromosomas 3 y 4, la pérdida de esta secuencia en el cromosoma 4 (no el cromosoma 3) se ha asociado con la inducción de resistencia al metronidazol, sin embargo aún se desconoce el proceso por el cual esto sucede (Townson *et al.*, 1992; Upcroft *et al.*, 1992; Upcroft *et al.*, 1997).

El gen *crp136* es uno de los primeros genes que han clonado de *Giardia*, tiene una secuencia de regiones tándem repetidas (Yang y Adam, 1994) que codifica a 23.5 copias de 40 aminoácidos repetidos con un motivo relacionado con una familia de genes de sarafotoxina el cual es de 120 pb (GenBank: AF249878.1) (Fig. 8); también exhibe un alto nivel de similitud con *crp65* en las regiones no repetidas (Chen *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Upcroft *et al.*, 1997). El gen *crp136* pertenece a una familia que tiene regiones repetidas dentro de un "cassette" que es altamente conservado (Chen *et al.*, 1996).

1561 agagaggtgc gatctgagtc tggccctcac cgatcctggt cctatcgaag tcaaggggaa
 1621 ctgcaactatc aactagcctc cgatgggtgt gtcctctatc cgtcctctc cagtccaact
 1681 gatcaagaga gcaagagcgg ttgacctca ctgctcgcgg caacacatca gcctgatgaa
 1741 aaagcagtag cacacgaact cccgctaatg ttggtaggat ttctcctagt ttgtgcaacc
 1801 gtgctggcaa aggacagcgg gaaggacaca tgcttcccgg gctacaccct caacactgac
 1861 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 1921 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 1981 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2041 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2101 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2161 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2221 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2281 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2341 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2401 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2461 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2521 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2581 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2641 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2701 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2761 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2821 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 2881 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 2941 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3001 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3061 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3121 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3181 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3241 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3301 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3361 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3421 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3481 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3541 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3601 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3661 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3721 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3781 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3841 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 3901 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 3961 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 4021 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 4081 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 4141 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 4201 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 4261 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 4321 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 4381 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 4441 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 4501 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaacg tcgagggctg tgagacctgc
 4561 gtggagggca acgcccagca gtgcaagacg tgccgtccgg gctacaccat caacactgac
 4621 acgaagcagt gcaccaagga cccagaagcg ccgtgcaata ctcccaactg taagacctgt
 4681 gacaacccca aaacagacaa cgaatctgc actaaatgta atgatggcga ctacctcacc
 4741 cctacaaacc aatgctgacc tgactgcaca gccatcagcg gatactacgg agatactgac
 4801 aagaagtgtg aggcattgcaa ccctgagtg cctgagtgcc ttggaccggc caacaatcag
 4861 tgcacggcct gtcctgttgg gaaaatgctt cagtatacag atactaatac tctgtgct
 4921 gggggcacgt gcatggacca gtgcagcgtg agttctacaa acgatggatg cgcagagtgt
 4981 ggggctcaga taggaggaac tgcatattgc tcaaagtgca agaacactca acaagcccc
 5041 ttgaacggca actgtgccc cagttcacga gtagccttct gtgcaacaat cacaagtggg
 5101 gcctgtacaa aatgcaatga gggttacttc ctcaaggacg gcggctgcta tcagacagat
 5161 agacagcctg gtaagcaggt gtgtagtaat gcacagggag gcaatggtaa gtgtcagaca
 5221 tgtgccaatg gcttagcagc aagtgatggc aactgtgcag aatgtcattc tacttgtct
 5281 acgtgctcga ctgcagatgc ggctgacaag tgcaagacct gtgccactgg gtataacaag
 5341 gaaaacggtg acgataccac tgctgggtta tgcaagaagt gctcagagaa gatctctgga
 5401 tgcaagcaat gtgtgtcgtc atctggcagt tcagtcatat gcttagaatac agaagtaggc
 5461 actgggtggaa gcgtcaacaa gagcggcctc agcacggggg ccatagccgg tatctctgtt
 5521 gctgtgattg ttattgtagg ttgctctgtc ggattccttt gctgggtggt cctctgccgc
 5581 ggggaaggca agacttagct gtgtacttag gtgtactaac gttacttta tgtagctcgt
 5641 gtagatgtgc tgcaggagct atctgagcgt gatccagaga tcatgcggtt aatcctcgt
 5701 ctttcctggc cgtccggaaa cgatggctgg tcgtggataa tgtaacgagg agctc

Figura 8. Secuencia de nucleótidos del gen *crp136* (GenBank: AF249878.1). Subrayado con rojo y azul cada una de las secuencias repetidas de 120 pb. En la posición 1768 se encuentra el codón de inicio y en 5592 se encuentra el codón de término.

Este gen tiene una frecuencia de 78% de uso de nucleótidos G+C en la tercera posición del codón, presenta un 35.5% de selección de codones efectivos, es decir, una medida de la falta de uniformidad en general del uso dentro de los grupos de codones sinónimos, donde los valores van de un 20% (sesgo extremo donde solo un codón se utiliza por aminoácido) a 61% (uso del codón al azar) (Lafay y Sharp, 1999).

Este gen como se ha mencionado anteriormente, codifica a una proteína VSP (CRP136) que tiene un dominio transmembranal altamente conservado de cerca de 38 aminoácidos, un dominio C-terminal citoplasmático conservado de CRGKA (Gillin *et al.*, 1990; Mowatt *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 2006) y una péptido señal N-terminal altamente variable, así como numerosas secuencias motivo CXXC (Adam *et al.*, 1988; Gillin *et al.*, 1990; Nash, 1997; Davids *et al.*, 2006).

La proteína CRP136 consta de 1274 aminoácidos y presenta un 14.2% de contenido de cisteína (Lafay y Sharp, 1999). Dentro de las funciones biológicas que realiza esta proteína es actividad de proteasa, resistencia a sales biliares y metales pesados (Chen *et al.*, 1996).

2. Justificación

G. intestinalis es un parásito zoonótico que infecta a una gran cantidad de mamíferos incluido el hombre. Esta parasitosis puede ser asintomática o sintomática. Afecta principalmente a la población infantil provocando malabsorción intestinal que se ve reflejada en un déficit cognitivo.

Debido a que los trofozoítos y quistes de *G. intestinalis* que se han obtenido de diferentes hospederos son morfológicamente semejantes se han utilizado técnicas moleculares para poder diferenciarlos y se han descrito ocho ensamblados o genotipos.

Solo se conoce un reporte donde se encontró que el gen *crp136* de una clona de *G. intestinalis* resistente al metronidazol tiene una similitud del 57% con el gen que codifica a una toxina de víbora (sarafotoxina), y cuya mordedura conduce a un cuadro clínico similar al presentado por la infección por *Giardia* sugiriendo la presencia de una posible toxina causante de la sintomatología, además hasta el momento no existen marcadores genéticos de virulencia asociados a toxinas.

Por todo lo anterior es importante demostrar si los aislados de *G. intestinalis* obtenidos de diferentes hospederos (pacientes pediátricos, bovinos, ovinos y gatos) tienen la secuencia del gen *crp136* similar al gen de la sarafotoxina, siendo la presencia del gen la primera evidencia de virulencia asociada a toxicidad.

3. Hipótesis

El gen de una proteína rica en cisteína (*crp136*) que se encontró en un aislado de una clona de *Giardia* resistente al metronidazol y que tiene una secuencia similar a una toxina (sarafotoxina) de la serpiente *Atractaspis enggadensis*, se encontrará en todos los aislados de *G. intestinalis* obtenidos de diferentes hospederos que se analicen.

4. Objetivo

Objetivo general

Comparar la secuencia del gen *crp136* de 10 aislados de *G. intestinalis* obtenidos de diferentes hospederos con la secuencia del gen de la sarafotoxina.

Objetivos Específicos

- Obtener el DNA de los 10 aislados de *G. intestinalis* de los diferentes hospederos.
- Amplificar el gen *crp136* de los 10 aislados de *G. intestinalis* de los diferentes hospederos.
- Secuenciar el gen *crp136* en los 10 aislados de *G. intestinalis*
- Determinar el grado de similitud entre las secuencias de 10 aislados obtenidos de diferentes hospederos y el gen *crp136* de *G. intestinalis* mediante análisis in silico.

5. Material y Método

5.1 Aislados de *G. intestinalis*

Inicialmente se trabajó con 10 aislados, pero se adicionaron dos muestras que nos resultaron interesantes por su origen, finalmente un total de 11 aislados de *Giardia* obtenidos de pacientes (sintomáticos y asintomáticos), animales domésticos (bovinos, ovinos y felinos) y la cepa de referencia (WB) (Tabla 2) fueron analizados.

Tabla 2. Aislados de *G. intestinalis*

Aislado/Fecha de obtención	Origen	Sintomáticos (S) /Asintomáticos(A)	Genotipo
WB/110900	Cepa de referencia	S	AI
INP-HGinv/070400	Paciente pediátrico con diarrea y dolor abdominal	S	AI
INP-HGinvDT/220706	Paciente pediátrico con diarrea y dolor abdominal, recibió tratamiento	S	AI
INP-RCB/011210	Paciente pediátrico enviado a neumología	A	AI
INP-ALAN/040708	Paciente pediátrico	A	AI
INP-B45/061208	Bovino	*	AI
INP-B47/270708	Bovino	*	AI
INP-O3/120703	Ovino	*	AI
INP-B2Q1G3/150600	Ovino	*	AI
INP-GiA/270511	Felino con presencia de diarrea	S	AI
INP-GiB270511	Felino con presencia de diarrea	S	AI
INP-EVE/160914	Paciente pediátrico con diarrea, cefalea, náusea, presencia de <i>B. hominis</i> (protozooario parasito), etc.	S	-

*No existen datos

5.2 Descongelamiento y mantenimiento de trofozoítos de *G. intestinalis*

Trofozoítos de cada uno de los aislados se descongelaron, se homogenizaron y se sembraron en medio TYI-S-33 (anexo) contenido en tubos de borosilicato de 13 x 100 cm³ con tapón de rosca. Los tubos se colocaron en una gradilla con una inclinación de 10° y se incubaron a 37°C. Los trofozoítos se resembraron cuando estaban en fase log de crecimiento.

El crecimiento poblacional se divide en tres fases: A) fase “lag” o de ajuste metabólico, es el tiempo en el que el inóculo se adapta a las condiciones del medio (6 horas). B) fase “log” se caracteriza por un crecimiento exponencial, los trofozoítos forman una monocapa sobre la pared del tubo (36 horas). C) fase estacionaria es cuando la capacidad de carga de trofozoítos en el cultivo ha llegado a tope (el medio de cultivo ya es inadecuado para el crecimiento celular), los trofozoítos se deforman, se hacen más grandes o se lisan (96 h).

5.3 Criopreservación de trofozoítos de *G. intestinalis*

Para contar con una reserva de trofozoítos y preservar el aislado se hicieron alícuotas de 2 tubos de cada aislado y se criopreservaron en nitrógeno líquido. Se preparó una suspensión de 5×10^6 células y se centrifugó a 1200 rpm/10 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en un vial con 2 mL de la solución de criopreservación (DMSO 10%) (Anexo). El vial se envolvió en una capa de algodón de un centímetro de espesor, se colocó en una caja de poliuretano a -70°C por 24h y posteriormente se transfirió a un tanque con nitrógeno líquido (~195°C).

5.4 Obtención de DNA de trofozoítos de *G. intestinalis*

Los trofozoítos en fase log se procesaron para la extracción del DNA:

1. Los tubos (5 tubos por aislado) se incubaron a 4°C durante 15 min y se centrifugaron a 2500 rpm/10 min. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de PBS (anexo) en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 2500 rpm durante un pulso de 30 segundos. El procedimiento se repitió tres veces para eliminar residuos de medio de cultivo.
2. Se colocaron 300 µL de solución de lisis y 10 µL (10 mg/mL) de proteinasa K a los trofozoítos de la última lavada (anexo), se homogeneizó y se incubó a 50°C durante toda la noche.
3. Para eliminar el RNA, se le agregó a los tubos 10 µL (10 mg/mL) de RNAsa (anexo) y se incubaron a 37°C/30 min.
4. A cada tubo se agregaron 500 µL de fenol y 500 µL de cloroformo, se homogeneizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente los tubos se centrifugaron a 12000 rpm/10 min/4°C. Se extrajo la fase acuosa y el procedimiento de lavado con fenol y cloroformo se repitió dos veces.
5. Se realizó una última extracción con 500 µL de cloroformo, se homogeneizó por 10 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar a 12000/10 min/4°C.
6. Se extrajo la fase acuosa y se colocó en otro tubo Eppendorf con 10% de acetato de sodio 3M (pH 7.0) y 1 mL de etanol absoluto, se homogeneizó y se incubó a -20°C, esto para la precipitación del DNA.

7. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm/10 min/4°C. El sobrenadante se decantó y se dejó que se evaporara el etanol. Finalmente el DNA se resuspendió en 30 µL de agua destilada.

5.5 Cuantificación de DNA de los aislados de *G. intestinalis*

1. El lector óptico del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) se calibró con 2 µL de agua destilada.
2. Para medir la concentración de DNA se colocaron 2 µL de cada una de las muestras.
3. En el NanoDrop 2000 se obtuvo la relación de DO 260/280, la cual debe estar en un rango de 1.8 a 2.0 e indica que la muestra es de DNA y que no tienen contaminación de proteínas o fenol. Los valores menores indican contaminación de la muestra con proteínas y valores mayores contaminación con fenol. El RNA también se encuentra en un rango de 1.8 a 2.0 en relación de DO 260/280, pero para las muestras de los aislados se utilizó RNAsa para degradar el RNA.

5.6 Integridad de DNA de los aislados de *G. intestinalis*

La integridad del DNA se determinó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

1. Se pesaron 300 mg de agarosa, se colocaron en un matraz de 125 mL y se le agregó 30 mL de TBE 1X (anexo). La agarosa se fundió, se agregó 0.7

μL (10 mg/mL) de bromuro de etidio y se mezcló suavemente; después, la solución se vertió en la charola. Se dejó solidificar durante 5 min/4°C.

2. A 1 μL de DNA de cada muestra se le agregaron 2 μL de buffer de carga (anexo) y se pusieron en los pozos del gel; la electroforesis fue a 100 volts, 10 miliamperios y 90 watts por 1 hora en amortiguador de TBE 1X. El DNA se observó en transiluminador de UV (BioImagin Systems).

5.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de un segmento de ~900 pb del gen *crp136* mediante PCR fue con los oligonucleótidos: T21 5'-CGA ACT CCG GCT ATG TTG GTA GGA TTT CTA TAG-3' y Toxin 22 5'-CAT CTG CAG TCG AG-3'

- La mezcla de reacción contenía 2.5 mM de MgCl_2 ; 10 mM de dNTP's; 10 μM de cada oligonucleótido; 2.5 U/ μL de DNA taq polimersa (AmpliTaq Gold DNA polymerase); 5 μL de GeneAmp 10X PCR Gold Buffer; 33.75 μL de agua milliQ y 100 ng de DNA de *G.intestinalis*.
- La mezcla de la reacción en un volumen final de 50 μL para cada uno de los aislados se centrifugó y se colocó en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystem).

Se realizó un gradiente de concentración de MgCl_2 y temperatura de alineamiento (TM) para determinar las condiciones que fueron adecuadas para realizar la PCR. Finalmente las condiciones de la PCR para la amplificación del DNA fueron una

etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 68°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y un ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos. Los amplicones obtenidos se identificaron en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE y 0.7 µL (10 mg/µL) de bromuro de etidio. La amplificación se repitió por triplicado (total 150 µL por cada aislado) para la secuenciación.

La amplificación de un segmento de ~220 pb del gen *crp136* fue con los oligonucleótidos: T21 5'-CGA ACT CCG GCT ATG TTG GTA GGA TTT CTA TAG-3' y T120-2 5'-TGT TGA TGG TGT AGC CCG GA-3'

- La mezcla de reacción contenía 3.0 mM de MgCl₂; 10 mM de dNTP's; 10 µM de cada oligonucleótido; 2U/µL de DNA taq polimera (AmpliTaq Gold DNA polymerase); 5 µL de GeneAmp 10X PCR Gold Buffer; 34.1 µL de agua milliQ y 100 ng de DNA de *Giardia*.
- La mezcla de reacción en un volumen final de 50 µL para cada uno de los aislados se centrifugo y se colocó en el termociclador.

Se realizó un gradiente de concentración de MgCl₂ y temperatura de alineamiento (TM) para determinar las condiciones que fueron adecuadas para realizar la PCR. Finalmente las condiciones de la PCR para la amplificación del DNA fueron: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 65°C durante 20 segundos y 72°C durante 20

segundos, y un ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos. Los amplicones obtenidos se identificaron en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE y 0.7 µL (10 mg/µL) de bromuro de etidio.

Las condiciones de la PCR para la amplificación de las regiones repetidas en tándem de 120 pb del gen *crp136* (~220, 340, 460 y 580 pb) fue una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos a 95°C durante 40 segundos, 65°C durante 40 segundos y 72°C durante 40 segundos, y un ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos. Los amplicones obtenidos se identificaron en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE y 0.7 µL (10 mg/µL) de bromuro de etidio.

Para verificar la presencia del gen *crp136* (~900 pb y ~220 pb) de *Giardia* en los diferentes aislados, los amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1% como se describió anteriormente.

5.8 Extracción y purificación del amplicon por PCR

El amplicon de la amplificación se visualizó en un transiluminador de UV (Biolmagin Systems), el DNA (banda) inmerso en el gel se cortó con un bisturí y se colocó en un tubo de 1.5 mL.

Para la purificación del DNA se utilizó el kit comercial (Montagé Life Science PCR Purification Kit Genomics), inmediatamente el amplicon de PCR (amplificado) se colocó en una columna de elución en el tubo colector. Se centrifugó a 5000 rpm/30

seg. Después la columna se colocó en otro tubo colector y se volvió a centrifugar a 5000 rpm/30 seg. Finalmente, la elución de ambos tubos colectores se cuantificó en un NanoDrop. La integridad del DNA se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.9 Secuenciación

Para la secuenciación se prepararon los tubos (rotulados) con cada uno de los amplicones (~900 y ~220 pb) del gen *crp136* de cada aislado de *Giardia*. Cada uno de los tubos contenía 10 µL del amplificado de DNA (muestras), la concentración fue de 20 a 100 ng/µL). También se prepararon los tubos (rotulados) con los oligonucleótidos: Toxin 22, T120-2 y T21 (10 picomol/µL), los cuales se colocaron en tubos de 0.5 mL.

Las muestras se secuenciaron en un equipo ABI 3500xl de 24 capilares en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM (Convenio Instituto Nacional de Pediatría-UNAM).

5.10 Análisis de Secuencias

Los amplicones secuenciados se editaron con el programa Bioedit. Con el programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se compararon las secuencias obtenidas contra las secuencias reportadas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se hizo la alineación con los programas MEGA y CloneManager para determinar el porcentaje de identidad entre las secuencias obtenidas en este trabajo y las secuencias reportadas.

Se realizó un análisis de máxima probabilidad (maximum-likelihood) con el programa ClustalW y Sequencher para establecer que tan parecidas son las secuencias. Para realizar los árboles guía o dendogramas (similitud de secuencias) se utilizaron los softwares MEGA, raxmlGUI, FigTree y CloneManager.

6. Resultados.

6.1 Cultivo *in vitro* de los aislados de *G. intestinalis*

Con todos los aislados se observó que los trofozoítos de *Giardia* formaron una monocapa sobre la superficie de los tubos de cultivo (Fig. 9).

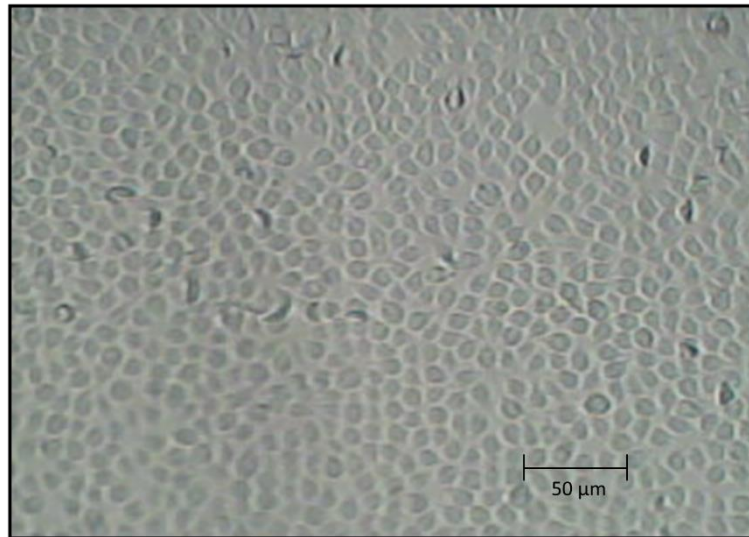


Figura 9. Microfotografía que muestra trofozoítos del aislado INP-HGinv de *G. intestinalis* formando monocapa en una región del tubo de cultivo. 40X

6.2 Cuantificación y pureza de DNA de los aislados de trofozoítos de *G. intestinalis*.

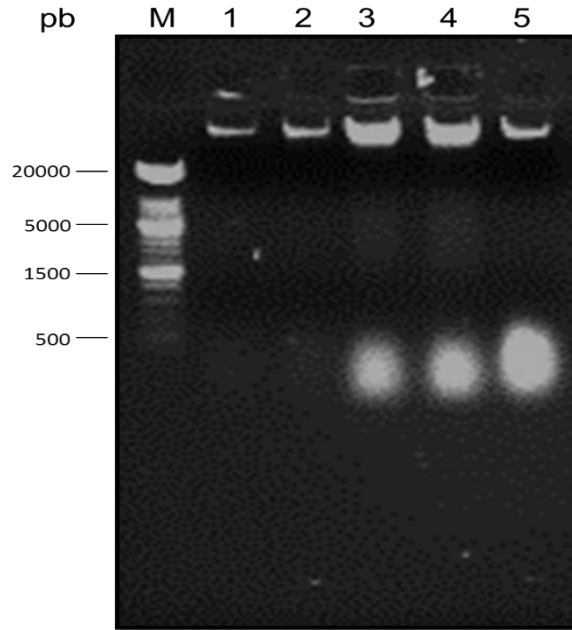
La concentración de DNA que se obtuvo de cinco tubos/aislado fue desde 3186.8 - 5202.2 ng/ μ L, la pureza del DNA obtenido fue realizada en base a las lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en el espectrofotómetro, y el valor que se obtuvo fue de 1.86–1.98 (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración y pureza de DNA de aislados de *G. intestinalis*.

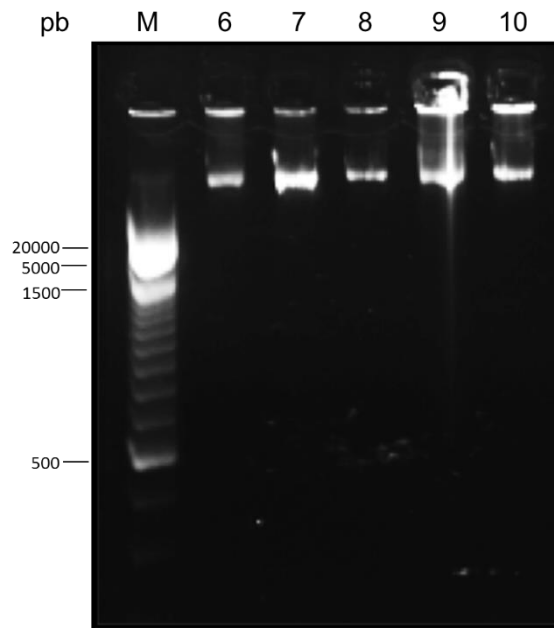
Aislado	Concentración (ng/μL)	Pureza 260/280
WB	5 202.2	1.93
INP-HGinv	5 027.1	1.83
INP-HGinvDT	3 959.8	1.86
INP-RCB	4 735.5	1.84
INP-ALAN	3 186.8	1.95
INP-B47	5 038.3	1.84
INP-B2Q1G3	4 639.2	1.91
INP-O3	3 655.2	1.88
INP-B45	4 930.1	1.92
INP-GiA	4 469.6	1.98
INP-GiB	5 019.9	1.89
INP-EVE	4 494.0	1.87

6.3 Integridad de ácidos nucleicos de los trofozoítos de *G. intestinalis*.

La integridad de los ácidos nucleicos sin y con tratamiento con RNAsa se observó mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% (Fig. 10, 11).



Figuras 10. Integridad del DNA de los aislados de *G. intestinalis* sin tratamiento de RNAsa. M: Marcador de peso molecular (1 kb). pb: pares de bases. Carril 1: aislado INP-B47. Carril 2: aislado INP-B45. Carril 3: aislado INP-03. Carril 4: aislado INP-GiA. Carril 5: aislado: INP-GiB.



Figuras 11. Integridad del DNA de los aislados de *G. intestinalis* con tratamiento de RNAsa. M: Marcador de peso molecular (1 kb). pb: pares de bases. Carril 6: aislado WB. Carril 7: aislado INP-HGinv. Carril 8: aislado INP-HGinvDT. Carril 9: aislado INP-RCB. Carril 10: aislado INP-ALAN.

6.4 Electroforesis de los amplicones de ~900 pb de los aislados de *G. intestinalis*.

Se obtuvo un amplicon de ~ 900 pb en los aislados WB, INP-HGinv, INP-HGinvDT, INP-RCB, INP-ALAN, INP-B45, INP-B47, INP-O3, INP-B2Q1G3 e INP-EVE. No hubo amplificación del DNA de los aislados INP-GiA e INP-GiB (Fig. 12, 13).

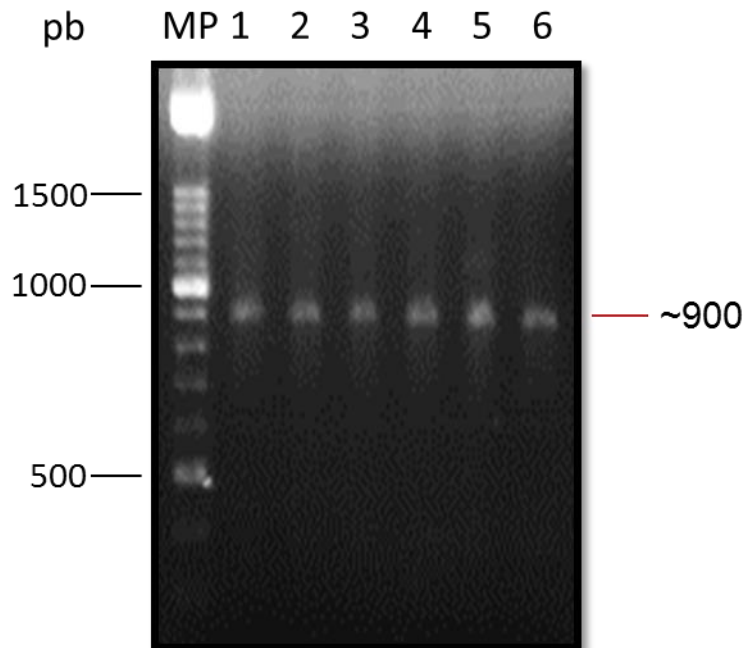


Figura 12. Corrimiento electroforético del amplicon del gen *crp136* con los oligonucleótidos T21/Toxin22 de los aislados de *G. intestinalis*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb). pb: pares de bases. Carril 1: aislado WB. Carril 2: aislado INP-HGinv. Carril 3: aislado INP-HGinvDT. Carril 4: aislado INP-RCB. Carril 5: aislado INP-ALAN. Carril 6: aislado INP-B45.

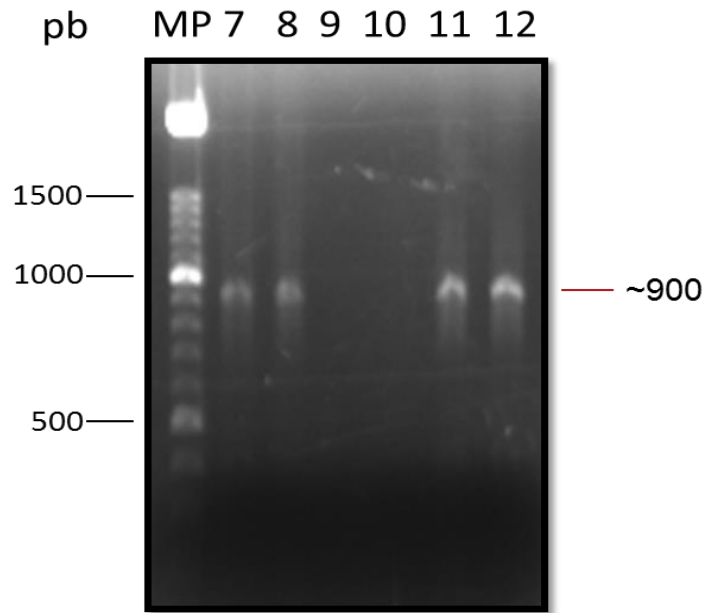


Figura 13. Corrimiento electroforético del amplifcon del gen *crp136* con los oligonucleótidos T21/Toxin22 de los aislados de *G. intestinalis*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb). pb: pares de bases. Carril 7: aislado INP-B47. Carril 8: aislado INP-O3. Carril 9: aislado INP-GiA. Carril 10: aislado INP-GiB. Carril 11: aislado INP-B2Q1G3. Carril 12: aislado INP-EVE.

6.5 Electroforesis de los amplicones ~220 pb del gen *crp136* de los aislados de *G. intestinalis*.

Se observó una banda de aproximadamente ~220 pb correspondiente a los aislados WB, INP-HGinv, INP-ALAN, INP-RCB, INP-B45, INP-B47, INP-O3 e INP-B2Q1G3. No hubo amplificación de las muestras de los aislados INP-HGinvDT e INP-EVE (Fig. 14). Los aislados INP-GiA e INP-GiB no amplificaron ningún producto (datos no mostrados).

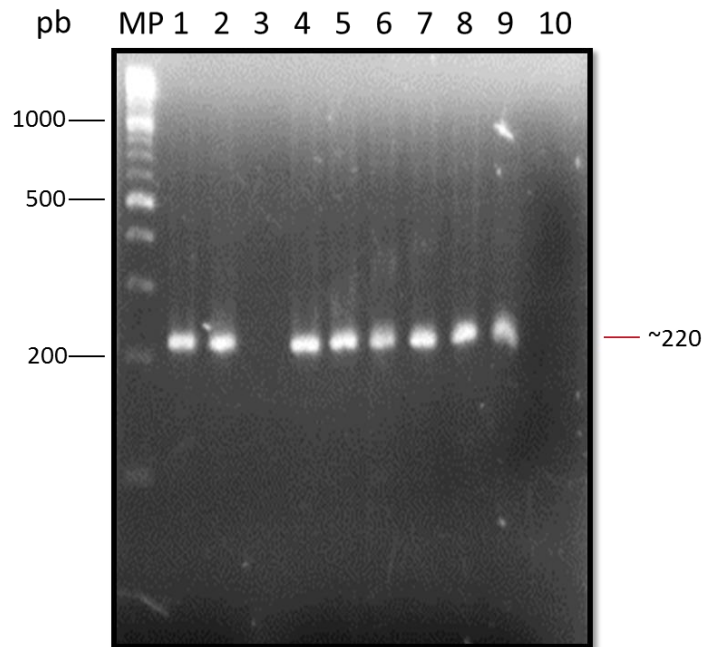


Figura 14. Corrimiento electroforético del amplificado del gen *crp136* con los oligonucleótidos T21/T120-2 de los aislados de *G. intestinalis*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb). pb: pares de bases. Carril 1: aislado WB. Carril 2: aislado INP-HGinv. Carril 3: aislado INP-HGinvDT. Carril 4: aislado INP-ALAN. Carril 5: aislado INP-RCB. Carril 6: aislado INP-B45. Carril 7: aislado INP-B47. Carril 8: aislado INP-O3. Carril 9: aislado INP-B2Q1G3. Carril 10: aislado INP-EVE.

6.6 Electroforesis de los amplicones de ~220, 340, 460 y 580 pb del gen *crp136* de los aislados de *G. intestinalis*.

Se observaron bandas de aproximadamente ~220, 340, 460 y 580 pb correspondientes a los aislados WB, INP-HGinv, INP-ALAN, INP-RCB, INP-B45, INP-B47 e INP-O3. Solo se observó una banda de ~220 pb para el aislado INP-B2Q1G3. No se observaron bandas para los aislados INP-HGinvDT e INP-EVE (Fig. 15). Los aislados INP-GiA e INP-GiB no amplificaron ningún producto (datos no mostrados).

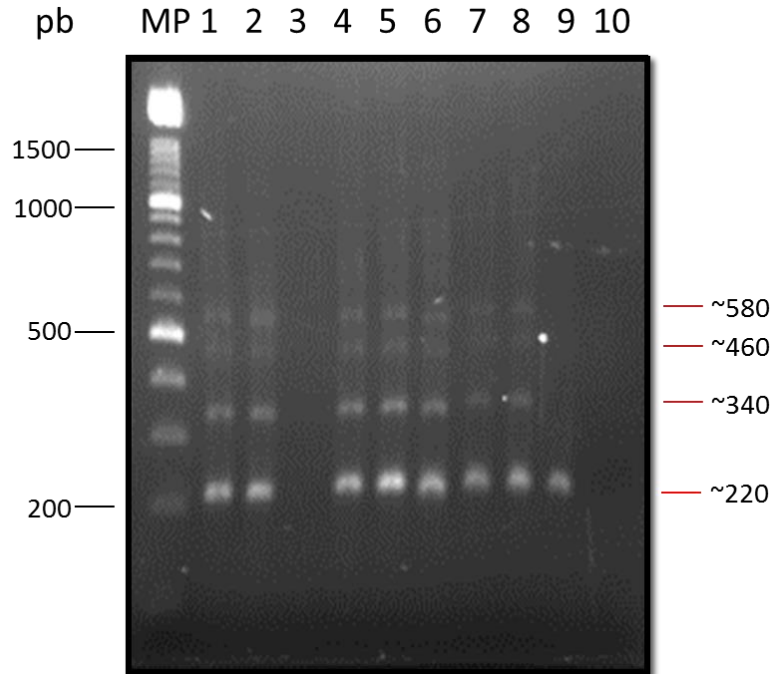


Figura 15. Corrimiento electroforético del amplificado del gen *crp136* con los oligonucleótidos T21/T120-2 de los aislados de *G. intestinalis*. MP: Marcador de peso molecular (100 pb). pb: pares de bases. Carril 1: aislado WB. Carril 2: aislado INP-HGinv. Carril 3: aislado INP-HGinvDT. Carril 4: aislado INP-ALAN. Carril 5: aislado INP-RCB. Carril 6: aislado INP-B45. Carril 7: aislado INP-B47. Carril 8: aislado INP-O3. Carril 9: aislado INP-B2Q1G3. Carril 10: aislado INP-EVE.

6.7 Cuantificación y pureza de los amplicones de ~900 pb y ~220 pb para la secuenciación.

Se obtuvieron desde 507.4 hasta 563.3 ng/ μ L de DNA del amplicon de ~900 pb de las 10 muestras de *G. intestinalis*. La pureza de cada muestra se observa en la Tabla 4. La concentración del amplicon de ~220 pb de las 8 muestras de *G. intestinalis* fue desde 83.7 hasta 100.7 ng/ μ L (Tabla 5).

Tabla 4. Concentración y pureza del amplicon de ~900 pb del gen *crp136* de aislados de *G. intestinalis*

Muestra	ng/μL	260/280
WB	510.5	1.80
INP-HGinv	534.3	1.81
INP-HGinvDT	519.6	1.83
INP-RCB	513.9	1.90
INP-ALAN	527.9	1.93
INP-B45	524.7	1.88
INP-B47	563.3	1.86
INP-O3	512.0	1.85
INP-B2QIG3	507.4	1.80
INP-EVE	519.0	1.81

Tabla 5. Concentración y pureza del amplicon de ~220 pb del gen *crp136* de aislados de *G. intestinalis*

Muestra	ng/μL	260/280
WB	83.7	1.95
INP-HGinv	88.6	1.93
INP-RCB	117.6	1.90
INP-ALAN	100.7	1.96
INP-B45	93.6	1.97
INP-B47	95.0	1.91
INP-O3	90.3	1.94
INP-B2QIG3	93.5	1.93

6.8 Secuenciación

6.8.1 Alineación del amplicon de ~900 pb de las muestras de *G. intestinalis*

De las 10 muestras secuenciadas, se realizó la alineación múltiple en ocho, las otras dos presentaron una secuencia incompleta. Se observó que seis muestras son muy similares entre sí (WB, INP-HGInv, INP-RCB, INP-ALAN, INP-B47 e INP-O3), y las otras dos muestras (INP-EVE e INP-HGInvDT) presentaron a su vez también mayor parecido entre ellas (Fig. 16).



Figura 16. Alineación múltiple del amplicon de ~900 pb de los ocho aislados de *G. intestinalis* con el software CloneManager. En verde nucleótidos con 100% de identidad dentro de las secuencias alineadas. (-): Gaps o deleción de nucleótidos.

Cuando se realizó el análisis de BLAST se encontró que seis muestras presentaron un alto grado de identidad (Anexo: ejemplo 1) con la secuencia de

Giardia lamblia ATCC 50803 High cystein protein (XM_001704503.1) (Fig. 17) reportada del GenBank con cobertura e identidad de entre 99 y 100% (Tabla 6). Mientras que las otras dos muestras presentaron mayor identidad (Anexo: ejemplo 2) con *Giardia lamblia* ATCC 50803 VSP with INR (XM_001707082.1) (Fig. 18) con cobertura de entre 88 y 99% e identidad de un 91 a 92 % (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de BLAST de las 8 muestras (~900 pb) de *G. intestinalis*

Aislado	pb total	Valor E	Cobertura (%)	Identidad (%)	Espacios (%)	No. acceso GenBank	Especie reportada en GenBank
WB	666	0	100	666/666(100)	0/666(0)	XM001704503.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 High cystein protein (GL50803_101589)
INP-HGinv	777	0	100	777/777(100)	0/777(0)	XM001704503.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 High cystein protein (GL50803_101589)
INP-HGinvDT	666	0	88	543/593(92)	13/593(2)	XM001707082.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 VSP with INR (GL50803_101010)
INP-RCB	738	0	100	738/738(100)	0/738(0)	XM001704503.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 High cystein protein (GL50803_101589)
INP-ALAN	827	0	100	827/828 (99)	1/828(0)	XM001704503.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 High cystein protein (GL50803_101589)
INP-B47	675	0	99	668/670(99)	0/670(0)	XM001704503.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 High cystein protein (GL50803_101589)
INP-O3	540	0	100	540/542(99)	2/542(0)	XM001704503.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 High cystein protein (GL50803_101589)
INP-EVE	715	0	81	541/592(91)	14/592(2)	XM001707082.1	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 VSP with INR (GL50803_101010)

pb: pares de bases. Valor E: Número de emparejamientos con el mismo puntaje esperado por azar. Identidad: Porcentaje de similitud entre la secuencia reportada en el GenBank y la muestra. Espacios: Porcentaje de huecos que se utilizaron para maximizar la alineación.

Adicionalmente en el BLAST también se encontró similitud con *crp136* (*Giardia intestinalis* isolate Ad-1 clone 3 type A-I variant-specific surface protein VSP136 (AF249878.1) para el amplicon de ~900 pb pero con un menor porcentaje de identidad (78%) y cobertura (69-92%) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de BLAST de las 8 muestras (~900 pb) de *G. intestinalis* comparada con la secuencia del gen *crp136*

Aislado	pb total	Valor E	Cobertura (%)	Identidad (%)	Espacios (%)	No. acceso GenBank	Especie reportada en GenBank
WB	666	8e 87	81	430/533(78)	23/553(4)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-HGinv	777	1e 86	69	430/553(78)	23/553(4)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-HGinvDT	666	1e 64	27	164/180(91)	0/180(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-RCB	738	9e 87	73	430/553(78)	23/553(4)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-ALAN	827	1e 86	69	430/533(78)	23/553(4)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-B47	675	4e 85	80	429/553(78)	23/553(4)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-O3	540	1e 68	92	391/510(77)	27/510(5)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-EVE	715	2e 89	31	210/228(92)	1/228(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136

pb: pares de bases. Valor E: Número de emparejamientos con el mismo puntaje esperado por azar. Identidad: Porcentaje de similitud entre la secuencia reportada en el GenBank y la muestra. Espacios: Porcentaje de huecos que se utilizaron para maximizar la alineación.

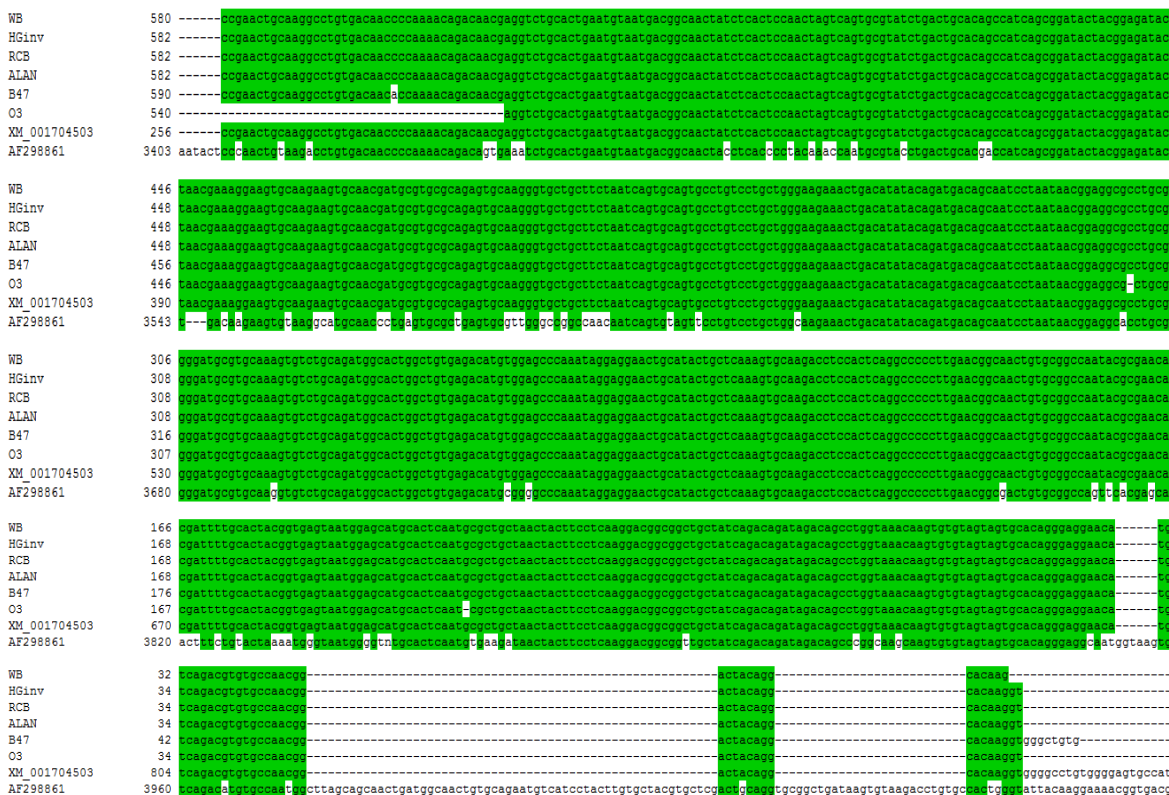


Figura 17. Alineación múltiple de los 6 amplicones de (~900 pb) *G. intestinalis* con la secuencia reportada en el GenBank: *Giardia lamblia* ATCC 50803 High cysteine protein (XM_001704503.1) y *Giardia intestinalis* isolate Ad-1 clone 3 type A-I variant-specific surface protein VSP136 (AF249878.1) con el software CloneManager. En verde nucleótidos con 100% de identidad dentro de las secuencias alineadas. (-): Gaps o deleción de nucleótidos.

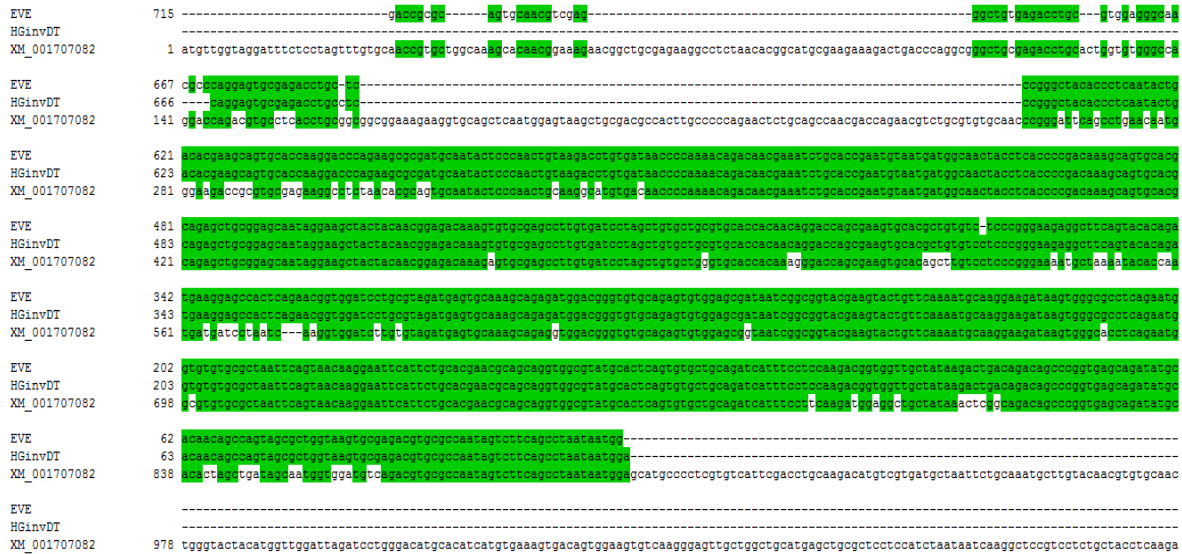


Figura 18. Alineamiento múltiple de dos muestras de *G. intestinalis* (~900 pb) con la secuencia reportada en el GenBank: *G. lamblia* ATCC 50803 VSP with INR (XM_001707082.1) con el software CloneManager. En verde nucleótidos con 100% de identidad dentro de las secuencias alineadas. (-): Gaps o deleción de nucleótidos.

Para el análisis de máxima probabilidad se realizó un árbol de similitud de secuencias entre los ocho aislados de ~900 pb de *G. intestinalis* con las secuencias reportadas en el GenBank. Se observó la formación de dos grupos dentro del árbol, un grupo de solo dos muestras de aislados de pacientes pediátricos relacionados con *G. lamblia* ATCC 50803 VSP with INR (XM_001707082.1), y otro grupo con seis muestras de aislados de pacientes pediátricos, ovinos, bovinos y la cepa de referencia que se relacionan con *G.lamblia* ATCC 50803 High cysteine protein (XM_001704503.1) (Fig. 19).

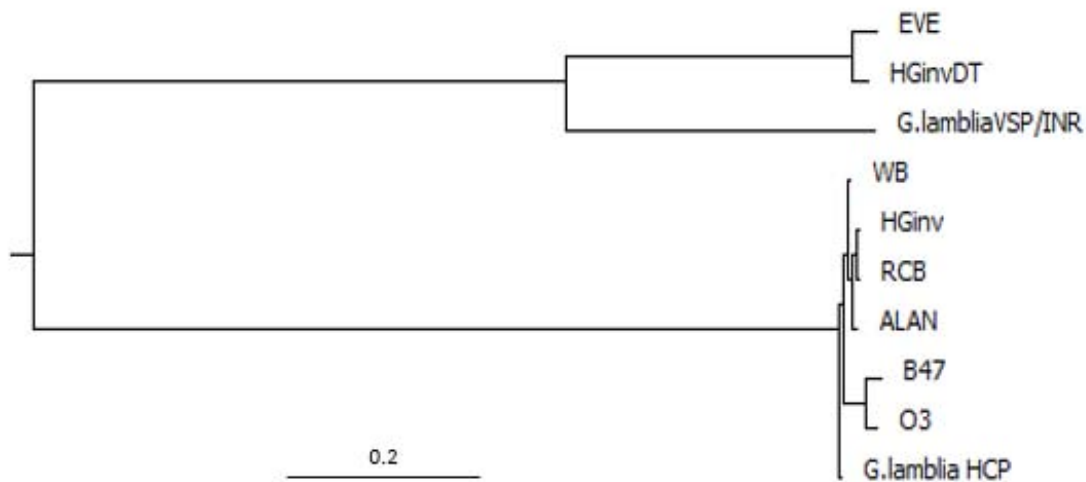


Figura 19. Árbol de similitud de secuencias (árbol guía: Máxima verosimilitud) de los ocho amplicones obtenidos de *G. intestinalis* (~900 pb). Barra escalar: No. de sustituciones de nucleótidos por sitio.

6.8.2 Alineación del amplicon de ~220 pb de las muestras de *G. intestinalis*

La alineación múltiple del amplicon de ~220 pb de las ocho muestras de *G. intestinalis*. Se observó que todas las muestras son similares entre ellas formando un grupo marcado (Fig. 20).

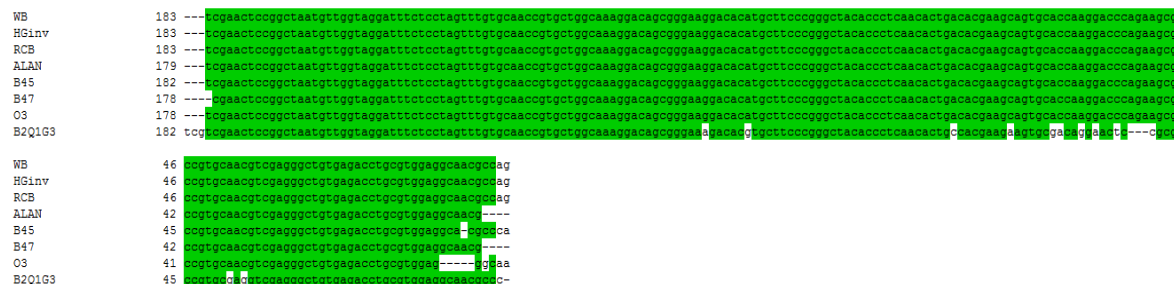


Figura 20. Alineación múltiple de los amplicones ~220 pb de *G. intestinalis*. En verde nucleótidos 100% idénticos dentro de las secuencias alineadas con el software CloneManager. (-): Gaps o deleción de nucleótidos.

Cuando se realizó el análisis de BLAST se encontró que las ocho muestras presentaron un alto grado de identidad con la secuencia de *Giardia intestinalis* isolate Ad-1 clone 3 type A-I variant-specific surface protein VSP136 (AF249878.1) reportada del GenBank y se determinó que existe al menos una copia repetida de 120 pb dentro de cada uno de los fragmentos en la alineación (Fig. 21).

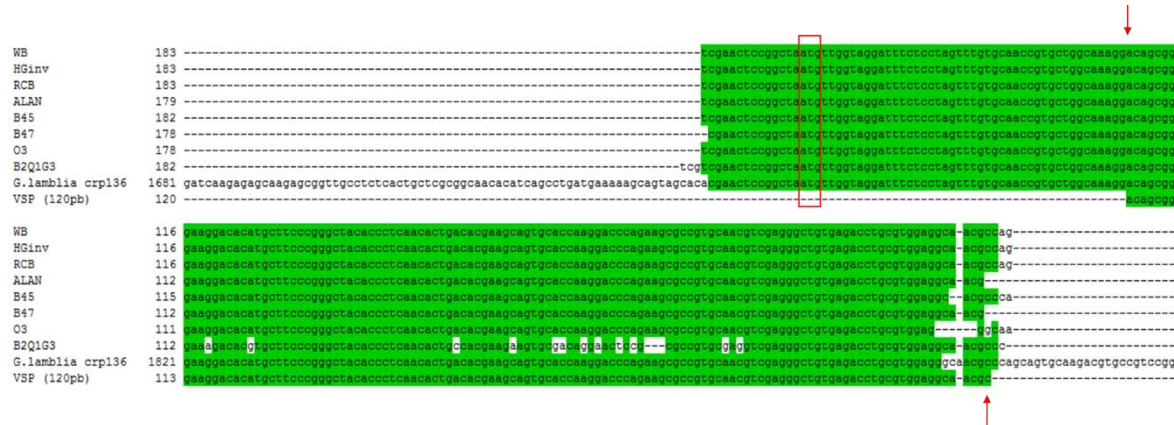


Figura 21. Alineación múltiple de los 8 amplicones (~220 pb) de *G. intestinalis* con la secuencia reportada en el GenBank: *Giardia intestinalis* isolate Ad-1 clone 3 type A-I variant-specific surface protein VSP136 (AF249878.1) con el software CloneManager. En verde nucleótidos con 100% de identidad dentro de las secuencias alineadas. En cuadro rojo el codón de inicio. Flechas: Inicio y fin de la secuencia repetida de 120 pb. (-): Gaps o deleción de nucleótidos.

Las secuencias de los aislados WB, INP-HGinv, INP-RCB, INP-ALAN, INP-B45, INP-B47 e INP-O3 mostraron una cobertura de entre 98 y 100% e identidad de 99 a 100%. Solo el aislado INP-B2Q1G3 mostro una cobertura del 97% la cual es buena pero mostro una identidad del 91%, ya que presenta a excepción de las otras siete un mayor porcentaje de gaps (4%) y pocos cambios de nucleótidos en su secuencia (aproximadamente 12) (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de BLAST de las 8 muestras (~220 pb) de *G. intestinalis*

Aislado	pb total	Valor E	Cobertura (%)	Identidad (%)	Espacios (%)	No. acceso GenBank	Especie reportada en GenBank
WB	183	3e -90	98	180/181(99)	1/181(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-HGinv	183	3e -90	98	180/181(99)	1/181(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-RCB	183	1e -89	98	180/181(99)	1/181(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-ALAN	179	4e -89	99	178/179(99)	1/179(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-B45	182	1e -89	99	181/183 (99)	2/183(1)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-B47	178	4e -89	100	178/179(99)	1/179(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-O3	178	3e -90	99	177/177(100)	0/177(0)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136
INP-B2Q1G3	182	4e -65	97	166/182(91)	4/182(2)	AF249878.1	<i>Giardia intestinalis</i> variant-specific surface protein VSP136

pb: pares de bases. Valor E: Número de emparejamientos con el mismo puntaje esperado por azar. Identidad: Porcentaje de similitud entre la secuencia reportada en el GenBank y la muestra. Espacios: Porcentaje de huecos que se utilizaron para maximizar la alineación.

Para el análisis de máxima verosimilitud se realizó un árbol de similitud de secuencias entre los ocho aislados de ~220 pb de *G. intestinalis* con la secuencia reportada en el GenBank. Se observó la formación de un grupo que incluye a todas las secuencias de los aislados de pacientes pediátricos, bovinos, ovinos y la cepa de referencia, excepto INP-B2Q1G3, aunque es parecido a las demás secuencias presenta algunos cambios de nucleótidos lo que lo excluye del grupo principal (Fig. 22).

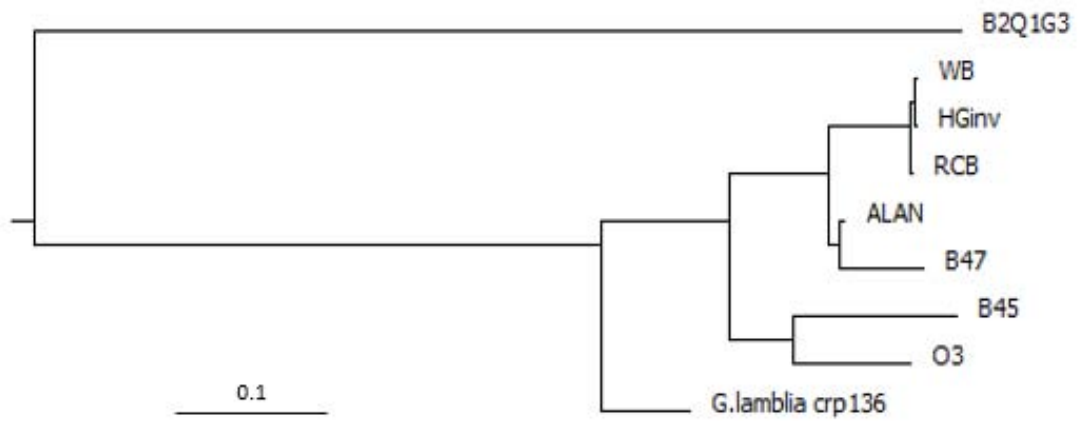


Figura 22. Árbol de similitud de secuencias (árbol guía: Máxima verosimilitud) de las ocho muestras de *G. intestinalis* (~220 pb). Barra escalar: No. de sustituciones de nucleótidos por sitio.

7. Discusión

En esta tesis nos propusimos analizar la secuencia del gen *crp136* de 10 aislados de *G. intestinalis*, adicionalmente dos aislados fueron tratados porque nos causaron cuestión debido a su origen. Un total de 12 aislados fueron analizados, de los cuales cinco aislados fueron obtenidos de humanos, dos de felinos, dos de ovinos y dos de bovinos y la cepa de referencia. Este gen se caracteriza por presentar repeticiones tipo tándem de 120 pb, y cuya secuencia es muy similar a la de una toxina (sarafotoxina) de la serpiente *Atractaspis enggadensis*.

Se han descrito varios mecanismos patogénicos mediante los cuales *G. intestinalis* provoca daño a su hospedero: la adherencia de los trofozoítos en el epitelio intestinal produce aplanamiento de microvellosidades y lisis celular; las enzimas que secreta alteran la integridad de las glicoproteínas de los enterocitos; produce desorganización de las uniones celulares que incrementan la permeabilidad transepitelial lo que conduce a apoptosis.

Se ha sugerido que un mecanismo patogénico puede ser el tóxico, pero aún no se ha logrado identificar alguna toxina. Upcroft *et al.* (1997) sugieren que existe una respuesta tóxica la cual se observó en la pérdida de peso de hasta el 20% en crías de ratones infectados con una cepa de *G. intestinalis* en cultivo *in vitro*, la cual se obtuvo de una muestra de intestino de una cacatúa muerta. La pérdida de peso es frecuentemente asociada con la producción de toxinas, debido a que alteran el transporte de electrolitos a través de la mucosa intestinal (Sears y Kaper, 1996).

Upcroft *et al.* (1998) demostraron en ratones adultos la pérdida de peso después de la administración oral de trofozoitos vivos de *G. intestinalis* (encontrada en *Cacatua galerita*) donde se observó la ausencia de una infección establecida. Por otra parte Meyer y Radulescu (1979) argumentan que la toxina excretada o el producto excretado puede ser el responsable de la diarrea asociada con la infección por *Giardia*, por lo cual muchos estudios *in vivo* de los síntomas de giardiasis se han relacionado con la producción de toxinas por parte del parásito (Belosevic *et al.*, 1989; Favennec, 1991).

Sin embargo, no todas las cepas de *G. intestinalis* que se han reportado en la literatura producen la misma pérdida de peso como la reportada en el genotipo aviar (Upcroft *et al.*, 1998). Esta es una evidencia directa de que existen cepas de *G. intestinalis* con diferente capacidad patogénica y que producen diferente pérdida de peso.

Se sabe que las infecciones causadas por *Giardia* pueden ser asintomáticas, una condición consistente con una cepa no patogénica o que se deba a un estado metabólico particular del parásito, o que quizá sea que secreta bajos niveles de CRPs en el intestino. Debido a esto, existe otra evidencia de la presencia de alguna toxina secretada por *Giardia*, en la que existe un cambio en la regulación del gen que resulta en la expresión de la toxina, que podría ser el mecanismo de cambios de una infección asintomática no patogénica a una sintomática patogénica que conlleve a una giardiasis severa (Chen *et al.*, 1995).

Upcroft *et al.* (1997) sugieren que la expresión de la toxina está regulada por la posición del gen, el cual se sitúa en una región subtelomérica, la cual a su vez está sujeta a la posición del telómero. Es decir, que durante el proceso de duplicación y reordenamiento del genoma, puede existir la pérdida de regiones subteloméricas seguidas de duplicación, duplicaciones parciales bajo estrés, y extensas duplicaciones internas entre diferentes cromosomas en diferentes aislados, lo que se muestra en la ganancia o pérdida de genes o fragmentos de genes, cambiando de esta manera el arreglo cromosomal (Chen *et al.*, 1994, 1995; Le Blancq, 1991; Upcroft *et al.*, 1988,1990,1993-1998; Upcroft y Upcroft, 1994,1998).

Los aislados que se estudiaron para este trabajo fueron de pacientes asintomáticos y sintomáticos (dolor abdominal, diarrea, náusea, malestar general, vómito, etc.), además de incluir aislados de otros hospederos (bovinos, ovinos y felinos) de los cuales no contamos con datos clínicos. Estos aislados se eligieron al azar para determinar si presentan el gen *crp136*, el cual se ha reportado que regula la expresión de la toxina.

En este trabajo se pretendía secuenciar el gen completo que es de aproximadamente 4000 pb (pares de bases), dentro del cual se sitúan 23.5 copias de 120 pb, las cuales corresponden al gen reportado en la literatura por Chen *et al.* (1995); sin embargo, al ser un gen muy grande se presentaron dificultades para poder amplificarlo. A pesar de que se diseñaron los oligonucleótidos que se consideraron adecuados para amplificar todo el gen (T21/Toxin22), se obtuvo una

banda y un amplicon de PCR de ~900 pb para 10 aislados (WB, INP-HGinv, INP-HGinvDT, INP-RCB, INP-ALAN, INP-B45, INP-B47, INP-O3, INP-B2Q1G3 e INP-EVE), sin embargo, no se observó ninguna banda para los aislados de felinos (INP-GiA e INP-GiB), lo que sugiere que no presentan este fragmento.

Las secuencias se editaron y se realizó la alineación múltiple de estos amplicones con la secuencia del gen *crp136* mediante el BLAST, se logró determinar el porcentaje de identidad y la región que se amplificó.

Se determinó que 6 de los aislados de ~900 pb (WB, INP-HGinv, INP-RCB, INP-ALAN, INP-B47 e INP-O3) que se amplificaron tienen mayor similitud en sus secuencias con el gen de una proteína altamente rica en cisteína de *G. intestinalis*, (*Giardia lamblia* High cysteine protein (XM_001704503.1)) y no con el gen *crp136*.

Esto se debe muy probablemente a que los genes de las HCP y las *crp* (VSP) pertenecen a la misma familia de multigenes, la cual se caracteriza por presentar motivos CXXC o CXC en sus proteínas debido a que tienen secuencias ricas en cisteína, por lo tanto, esto sugiere que con los oligonucleótidos utilizados se amplificó un fragmento del gen de una proteína altamente rica en cisteína y no el del gen propuesto (*crp136*), esto es porque tienen una secuencia muy similar entre sí y los oligonucleótidos no fueron específicos.

Por otro lado, dos aislados (INP-HGinvDT e INP-EVE) que también se amplificaron de ~900 pb tuvieron también mayor similitud con otra proteína de *G. intestinalis*

reportada en el GenBank: *Giardia lamblia* VSP with INR (XM_001707082.1) y con mucho menor porcentaje de similitud con el gen *crp136*. Los amplicones del gen que corresponden a una proteína variable de superficie rica en cisteína (VSP) que presenta un INR o elemento iniciador y también tiene motivos CXXC.

Estos dos amplicones son muy diferentes a los otros 6 amplicones ya que entre ellos no hay suficiente similitud, a pesar de que también se trata de una proteína rica en cisteína, sin embargo, las regiones donde existe similitud se debe a son secuencias ricas en cisteína. De la misma manera los oligonucleótidos no amplificaron el gen *crp136* para estos dos amplicones obtenidos.

Al ver que los amplicones no corresponden al gen *crp136* pero que son similares, se decidió amplificar ahora entonces el inicio del gen y contar al menos con una copia repetida de 120 pb y para ello se utilizaron otros oligonucleótidos (T21/T120-2); es importante señalar que el oligonucleótido T120-2 se une a los últimos 20 nucleótidos de la secuencia de 120 pb, por lo tanto, por probabilidad se puede unir a la primera copia, la segunda, la tercera, etc., esto dependiendo a que copia se una el oligonucleótido y también del programa de PCR que establecimos, ya que depende del tiempo elongación y síntesis de DNA.

De acuerdo con lo anterior se observaron bandas de ~220, 340, 460 y 580 pb, que corresponden desde el inicio del oligonucleótido T21 hasta el oligonucleótido T120-2, es decir, para la banda de ~220 pb son 101 pb desde el inicio y 120 pb de la secuencia repetida, para la de ~340 pb son 101 pb y 2 repeticiones de 120, para

la de ~460 pb son 101 pb y 3 repeticiones de 120 y para la de ~580 pb son 101 pb y 4 repeticiones de 120 pb.

Los resultados de electroforesis en agarosa nos indican que existen al menos 4 copias de 120 pb desde la región inicial del gen *crp136* hacia adelante de los aislados WB, INP-HGinv, INP-RCB, INP-ALAN, INP-B45, INP-B47 e INP-O3y solo una copia de ~220 pb para el aislado INP-B2Q1G3, y ninguna copia para los aislados INP-HGinvDT, INP-GiA, INP-GiB e INP-EVE.

Se decidió modificar el programa de PCR reduciendo el tiempo de elongación y síntesis para solo obtener la banda de ~220 pb, la cual se purificó y secuenció. Se realizó el alineamiento múltiple de estas 8 secuencias con la secuencia del gen *crp136* reportada en el GenBank (AF249878.1), y así se pudo determinar que hay evidencia de que existe al menos con una copia de 120 pb.

El alineamiento múltiple nos permitió determinar correspondencias de similitud a nivel de residuos individuales por medio de una matriz. Los eventos de inserción o deleción en las secuencias similares presentan distintas longitudes, por lo cual es necesario introducir gaps en el alineamiento para mantener la correspondencia entre sitios similares antes y después de las regiones gap. El árbol guía o de similitud de secuencias representa de manera aproximada las distancias calculadas entre todas las secuencias, nosotros utilizamos el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) mediante la

aplicación de Neighbor-join, donde éste nos indica que tan parecidas son las secuencias entre sí con la secuencia reportada.

El árbol guía del fragmento de ~900 pb mostró datos interesantes, tres grupos muy marcados, los cuales están formados por un grupo de 4 aislados que corresponden a la cepa de referencia y pacientes pediátricos (WB, INP-HGinv, INP-RCB e INP-ALAN), un segundo grupo de 2 aislados de artiodáctilos (INP-B47 e INP-O3), y ambos grupos son más parecidos a la secuencia reportada en el GenBank que corresponde a una proteína altamente rica en cisteína (HCP), y finalmente un tercer grupo de 2 aislados que corresponden a pacientes pediátricos (INP-HGinvDT e INP-EVE) los cuales son similares a una proteína VSP con un INR reportada en el GenBank y que presentan características diferentes a los otros aislados.

El árbol guía del fragmento de ~220 pb es muy diferente, esto debido a que no forma grupos marcados, pero es notable que todos los aislados se parecen entre sí, tanto de los pacientes pediátricos y los de artiodáctilos, y todos a su vez con la secuencia reportada en el GenBank que corresponde al gen *crp136*, el cual es el de nuestro interés, solo se observó un mínimo de diferencias para un aislado (INP-B2Q1G3) que seguramente fue por error en la secuenciación. En este árbol guía no están los amplicones de INP-HGinvDT e INP-EVE ya que no amplificaron ningún fragmento.

Con estos resultados hemos obtenido datos muy significativos, sabemos que al menos los aislados WB (cepa de referencia), INP-HGinv, INP-ALAN, INP-RCB, INP-B45, INP-B47 e INP-O3 tienen al menos 4 copias de 120 pb e INP-B2Q1G3 presenta una sola copia y los aislados INP-EVE e INP-HGinvDT no amplificaron para ninguna copia de 120 pb. Los aislados INP-GiA e INP-GiB no amplificaron para ningún par de oligonucleótidos, por lo tanto estos aislados al parecer no presentan el gen *crp136*.

Después de analizarlos resultados, también se determinó que no existe una aparente correlación de acuerdo con la sintomatología; esto, debido a que algunos aislados que no son sintomáticos (INP-RCB e INP-ALAN) presentan las mismas 4 copias repetidas que los sintomáticos (WB e INP-HGinv). En cuanto a los aislados de artiodáctilos (INP-B45, INP-B47, INP-O3 e INP-B2Q1G3) como no conocemos su evolución clínica no podemos determinar la sintomatología de estos, solo 3 aislados tienen 4 copias repetidas y 1 tiene solo una copia.

Por otra parte se ha reportado también por Belosevic *et al.* (1989), Favennec (1991), Chen *et al.* (1995), Troeger *et al.*, (2007) y Cacció & Ryan, (2008), que la sintomatología no necesariamente correlaciona con el genotipo, ya que no implica que un genotipo particular sea más virulento que otros menos comunes, y que muchas veces la sintomatología depende más del estado físico del hospedero, ésta podría ser una explicación al hecho de que la mayoría de los aislados pertenecen al genotipo AI y presentan sintomatología diferente. Es importante también enfatizar que hay aislados que no amplificaron y que presentaron

sintomatología marcada y un genotipo establecido (INP-EVE, INP-GiA e INP-GiB). Para los artiodáctilos, Otero *et al.* (2011) encontraron diferentes genotipos asociados pero de ellos no se conoció la sintomatología.

El hecho de que el gen *crp136* tenga una similitud del 57% a nivel de nucleótidos con el que codifica a una sarafotoxina (toxina de *Atractaspis enggadensis*), permite que se puede inferir que las proteínas resultantes expresadas de cada gen son similares y que posiblemente podrían compartir la misma función o parecida. Sin embargo, la similitud de secuencias es un resultado que proviene directamente de la observación y una alta similitud de secuencias puede deberse simplemente al azar.

Por todo lo anterior, no se determinó con exactitud si hay correlación del número de copias repetidas con la sintomatología, debido a que solo se obtuvo un número parcial de copias como se mencionó anteriormente, las cuales son diferentes para los aislados. Además por el número reducido de copias obtenidas con los oligonucleótidos utilizados, es conveniente diseñar otros oligonucleótidos que nos permitan secuenciar el gen completo o por partes y poder así obtener todas las copias que presente cada uno de los aislados.

Este es el primer reporte acerca de la presencia del gen *crp136* en diversos aislados de *G. intestinalis* obtenidos de diferentes hospederos (pacientes pediátricos, artiodáctilos y animales domésticos), ya que solo se conoce un reporte de Chen *et al.* (1995) en una cepa que fue resistente al metronidazol, y en algunos

de estos aislados no hay reporte de resistencia al metronidazol. Además de los aislados analizados sería conveniente poder analizar otros y así en un futuro poder contar con un registro de todos e identificar completamente marcadores de virulencia asociados a toxinas.

8. Conclusión

- Se amplificó parcialmente el *gen crp136* de *G. intestinalis* en 7 de 12 aislados obtenidos de diferentes hospederos y la cepa de referencia.
- Seis amplicones de ~900 pb que se amplificaron presentaron una secuencia similar a una proteína altamente rica en cisteína (HCP) de *G. intestinalis*.
- Dos amplicones de ~900 pb que se amplificaron presentaron una secuencia similar a una proteína variable de superficie (VSP) rica en cisteína con un INR.
- Los aislados WB (cepa de referencia); INP-HGinv, INP-ALAN, INP-RCB (pacientes pediátricos); INP-B45, INP-B47 (bovinos) e INP-O3 (ovino) tienen al menos 4 copias repetidas en tándem de 120 pb e INP-B2Q1G3 (ovino) presentó una sola copia.
- Los aislados INP-GiA e INP-GiB (gatos) no amplificaron el *gen crp136*.
- No se reconoce evidencia completa de virulencia debido a un número reducido de regiones repetidas en tándem en algunos aislados, pero se sugiere la presencia del *gen crp136* como un marcador genético asociado a toxinas.

9. Perspectivas

- Diseñar otros oligonucleótidos para poder amplificar completo el gen *crp136*, y poder contar con todas las unidades repetidas de 120 pb que presente cada aislado.
- Utilizar otras técnicas como Southern blot que respalden nuestros resultados, así éstos serán precisos y específicos; incluso se recomienda el uso de secuenciadores de última generación.

10. Anexo

Medio de cultivo TYI-S-33 pH 7.0 (1L)

Reactivos	Cantidad (g)
Ac. Ascórbico	0.200
Citrato de Fierro y Amonio	0.030
NaCl	2.0
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	0.600
Bilis bovina	1 .0
Cloruro de cisteína	1 .0
Extracto de levadura	10
Tryptona	20
Glucosa	10
H ₂ O desionizada	1.0 L

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó el pH 7.0, se adicionaron los antibióticos y el antimicótico (20 mg de gentamicina, 20 mg de estreptomicina, 10 mg de ampicilina, 10 mg de ceftazidina y 1 mg de anfotericina B) y se aforó a 1.0 L. El medio se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm, se complementó con 10% de suero fetal bovino y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Descomplementación de Suero Fetal Bovino

Se mantuvo una botella de suero de ternera fetal grado cultivo celular (Hyclone No. Cat. SH30070-03) durante 30 minutos a 56°C en baño María para descomplementarlo. El suero se fraccionó en tubos estériles de 50 mL y se almacenó a -20°C.

Solución de Criopreservación

Reactivo	Cantidad (mL)
Suero fetal de bovino (SFB)	9.0
Dimetilsulfóxido (DMSO)	1.0

El DMSO se esterilizó en autoclave. Bajo un ambiente de flujo laminar, se mezcló el SFB y el DMSO. Se guardó a -20°C hasta su uso.

Solución salina fosfatos (PBS) 10X

Reactivos	Cantidad (g)
NaCl	8.006
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.612
KH ₂ PO ₄	0.19

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó a pH 7.2, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C hasta su uso. Para hacer la solución a 1X se tomaron 100 mL de la solución PBS 10X y se aforaron con 900 mL de H₂O.

Solución de lisis (5.0 mL)

Reactivos	Concentrada	Necesaria	Tomar
Tris pH 7.4	2.0 M	10.0 mM	25.0 µL
EDTA	0.5 M	10.0 mM	100.0 µL
NaCl	5.0 M	50.0 mM	150.0 µL
SDS	10.0 %	0.4 %	200.0 µL
H ₂ O			4525.0 µL
Proteinasa K	10.0 mg/mL	200.0 g/mL	20.0 µL

En este orden se disolverán los primeros cuatro reactivos, se aforó a 5.0 mL con agua desionizada y esterilizada. La proteinasa K se agregó a los tubos que contenían las células con la solución de lisis.

Proteinasa K

Reactivo	Cantidad
Proteinasa K	10.0 mg
TE	1.0 mL

La proteinasa K se disolvió en 1.0 mL de TE, se dividió en 10 partes (100 µL) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

RNAsa

Reactivo	Cantidad
RNAsa	10.0 mg
TE	1.0 mL

La RNAsa se disolvió en 1.0 mL de TE, se dividió en 10 partes (100 µL) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amortiguador de Tris Boratos con Sal Disódica de Ácido Etilendiamina Tetraacético (TBE 20X) (1L)

Reactivos	Cantidad
Tris Base (1.0 M)	121.0 g
Ácido bórico (1.0 M)	61.7 g
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O (20.0 mM)	7.44 g
H ₂ O desionizada	1000.0 mL

Los reactivos se disolvieron en 800 mL de agua previamente esterilizada con autoclave, se aforo a 1000.0 mL y se almacenó a temperatura ambiente.

Solución de Bromuro de Etidio (BrE) 10 mg/mL

Reactivo	Cantidad
Bromuro de etidio	50.0 mg
H₂O	5.0 mL

Este reactivo se usó para visualizar ácidos nucleicos (DNA, RNA) ya que emite fluorescencia cuando se excita con una longitud de onda de 250 a 310 nm. Se manejó con guantes y se evitó la inhalación, ya que es altamente mutagénico y produce daño irreversible. Se colocó en un frasco de color ámbar, se mezcló y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Solución de carga de muestra

Reactivo	Cantidad
Glicerina	10.0 mL
Xylene Cyanol	25.0 mg
Azul de bromofenol	100.0mg
H ₂ O	10.0 mL

Se pesaron 100 ng de azul de bromofenol y se colocaron en un matraz de 125 mL, se le colocó 10 mL de agua destilada y 10 mL de glicerina. Se mezcló y se hicieron alícuotas de 5 mL y se guardó a 4°C hasta su uso.

Duodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

Reactivo	Cantidad
SDS	10.0 g
H₂O	100.0 mL

El SDS se disolvió con agua desionizada previamente esterilizada, evitando la inhalación de reactivo.

Acetato de Sodio 3.0 M

Reactivo	Cantidad
Acetato de sodio 3H ₂ O	40.8 g
H ₂ O	100 mL

El acetato de sodio se colocó en un vaso de 250 mL, se agregó 80 mL de agua, se ajustó el pH a 7.0 con ácido acético, se aforo a 100 mL y se esterilizó por filtración.

EDTA 0.5 (Sal disódica de ácido etilendiamina tetraacético)

Reactivo	Cantidad
EDTA-Na ₂ :2H ₂ O	93.05 g
H ₂ O	Aforar a 500 mL

El EDTA se colocó en un vaso de 600 mL, se agregó 300 mL de agua, se ajustó el pH a 8.0 con NaOH, se aforó y se esterilizó por autoclave.

Cloruro de sodio (NaCl) 5.0 M

Reactivo	Cantidad
NaCl	292.2 g
H ₂ O	1000.0 mL

Se disolvió la sal en 700 mL de agua, posteriormente se aforo a 1000 mL y se esterilizó por autoclave.

Amortiguador TE (Tris/EDTA) 100 mL

Reactivo	Cantidad
Tris 10.0 mM pH 7.4	500.0 mL del concentrado de 2.0 M
EDTA 0.1 mM pH 8.0	20.0 mL del concentrado de 0.5 M
H ₂ O	99.48 mL

Se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Anexo Ejemplo 1.

- INP-ALAN ~900 pb

Giardia lamblia ATCC 50803 High cysteine protein (GL50803_101589) mRNA, complete cds

NCBI Reference Sequence: XM_001704503.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS XM_001704503 1182 bp mRNA linear INV 20-MAY-2009

ORIGIN

```
1 atgttggtag gatttctcct agtttgtgca accgtgctgg ccaactgcdc aaccggccag
61 tgcagagcag gccacgtgcc gattgacgtg tgccctgata gctctgctgt ctacggcgca
121 gggtcogagt gcacggttcc gaactgcaag cgggtgcgcc aaggaaagcc cgcggagtgc
181 gaggagtgca actctaactt caacctcgat agcaaacaga agcagtgcaa cccagtgtcg
241 gccgagtgca cggttccgaa ctgcaaggcc tgtgacaacc caaaaacaga caacgaggtc
301 tgcactgaat gtaatgacgg caactatctc actccaacta gtcagtgcgt atctgactgc
361 acagccatca gcggatacta cggagatact aacgaaagga agtgcaagaa gtgcaacgat
421 gcgtgcgcag agtgcaaggg tgctgcttct aatcagtgca gtgcctgtcc tgctgggaag
481 aaactgacat atacagatga cagcaatcct aataacggag gcgcctgcgg ggatgcgtgc
541 aaagtgtctg cagatggcac tggctgtgag acatgtggag cccaaatagg aggaactgca
601 tactgctcaa agtgcaagac ctccactcag gcccccttga acggcaactg tgcggccaat
661 acgcgaacac gattttgcac tacggtgagt aatggagcat gcaactaatg cgctgctaac
721 tacttctca aggaacggcg ctgctatcag acagatagac agcctggtaa acaagtgtgt
781 agtagtgcac agggaggaac atgtcagacg tgtgccaacg gactacaggc acaaggtggg
841 gcctgtgggg agtgccattc tacttgtgct acgtgctcga ctgcagatgc ggctgataag
901 tgtaagactt gtgccactgg gtattacaag gaaaacggtg acgataccac tgatgggtta
961 tgcaagaagt gctcagagaa gatctctgga tgcaagcaat gtgtgtcatc atctggcagt
1021 tcagtcatat gcttagaatc agaagcaggc actggtgga gcgtaacaa gagcggcctc
1081 agcacaggcg ccatagccgg tatctccgtc gctgtgattg ttgtcgtcgg ggggcttgta
1141 ggctttctct gctggtggtt cctttaccgc ggggaaggcat ag//
```

Anexo Ejemplo 2.

- INP-HGinvDT~900 pb

Giardia lamblia ATCC 50803 VSP with INR (GL50803_101010) mRNA, complete cds

NCBI Reference Sequence: XM_001707082.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

```
LOCUS       XM_001707082          1260 bp    mRNA     linear   INV 20-MAY-2009
ORIGIN
   1 atgtttggtag gatttctcct agtttgtgca accgtgctgg caaagcacia cggaaagaac
  61 ggctgocgaga aggcctctaa cacggcatgc gaagaaagac tgaccagggc gggctgocgag
 121 acctgcactg  gtgtgggcca ggaccagacg tgccctcacct gcggcggcgg aaagaagggtg
 181 cagctcaatg  gagtaagctg cgacgccact tgccccaga  actctgcagc caacgaccag
 241 aacgtctgocg tgtgcaaccc gggattcagc ctgaacaatg ggaagaccgc gtgocgagaag
 301 gcctctaaca  cgcagtgcaa tactcccaac tgcaaggcat gtgacaaccc caaaacagac
 361 aacgaaatct gcaccgaatg taatgatggc aactacctca ccccgacaaa gcagtgcacg
 421 cagagctgocg gagcaatagg aagctactac aocggagaca aagagtgcga gccttgtgat
 481 cctagctgtg ctgggtgcac cacaaagggg ccagcgaagt gcacagcttg tcctccggg
 541 aaaatgctaa aatacaccaa tgatgatcct aatcaagggtg gatcttgtgt agatgagtgc
 601 aaagcagagg tggacgggtg tgacagagtg ggagcggtaa tcggcggtac gaagtactgt
 661 tcaaaatgca aggaagataa gtgggcaact cagaatggcg tgtgocgctaa ttcagtaaca
 721 aggaattcat tctgcacgaa cgcagcaggt ggcgtatgca ctcagtgtgc tgacatcat
 781 ttccttcaag atggaggctg ctataaactc ggcagacagc ccggtgagca gatatgcaca
 841 ctagctgata gcaatgggtg atgtcagacg tcgcocaata gtcttcagcc taataatgga
 901 gcatgcccct  cgtgtcattc gacctgcaag acatgtcgtg atgctaattc tgcaaatgct
 961 tgtacaacgt  gtgcaactgg gtactacatg gttggattag atcctgggac atgcacatca
1021 tgtgaaagtg  acagtggaag tgtcaagggg gttgctggct gcatgagctg cgctcctcca
1081 tctaataatc  aaggctccgt cctctgtctac ctcaagaacg gtgacagtac cggcgggaagc
1141 acgaacagga  gcgggctctc cactggcgc  atcgcgggta tctccgtcgc cgtgatcgtt
1201 gtcgtcggag  ggcttgtcgg ctctctctgc tgggtggtcc tctgccgcgg aaaggcatag
//
```

11. Literatura citada.

- Adam, R.D., Aggarwal, A., Lal, A.A., De la Cruz, V.F., Mccutchan, T., Nash, T.E. (1988) Antigenic variation of a cystein-rich protein in *Giardia lamblia*. *J Exp Med*, 167, 107–18.
- Adam, R.D. (1991) The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev*. 55, 706–32.
- Adam, R.D. (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14, 447-75.
- Al-Mohammed, H.I. (2011) Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitol Research*, 108, 1375-81
- Alcaraz, M.J. (2002) *Giardia* y giardiosis. SEIMC, 1-9.
- Andrews, R.H., Adams, M., Boreham, P.F.L., Mayrhofer, G., Meloni, B.P. (1989) *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol*, 19,183-90.
- Ankarklev, J., Jerlström- Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S.G. (2010) Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature*, 8, 413-22.
- Appelbee, A.J., Frederick, L.M., Heitman, T.L., Olson, M.E. (2003) Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol*, 112, 289-94.
- Argüello-García, R., Argüello-López, C., González-Robles, A., Castillo-Figueroa, A.M., Ortega-Pierres, M.G. (2002) Sequential exposure and assembly of cyst wall filaments on the surface of encysting *Giardia duodenalis*. *Parasitol* 125, 209-19.
- Astiazarán-García, H., Espinoza-Castellano, M., Castañón, G., Chávez-Munguia, B., Martínez-Palomo, A. (2000) *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol*, 95, 128-35.
- Baker, D.G., Strombeck, D.R., Gerschwin, L.J. (1987) Laboratory diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 190, 53-6.
- Barrera, H.A., Ortiz, R., Rojas, A., Reséndez, D. (1993) Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*, Conacyt 18 (108), 50-60.
- Barry, J.D., Ginger, M.L., Burton, P., McCulloch, R. (2003) Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? *Int J Parasitol*, 33, 29-45.

- Bazán-Tejeda, M.L., Arguello-García, R., Ortega-Pierres, G. (2008) La biogénesis del quiste de *Giardia duodenalis* como modelo de diferenciación unicelular. *Mensaje Bioquímico*, 32, 25-38.
- Belosevic, M., Faubert, G.M., Maclean, J.D. (1989) Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut*, 30, 1213-9.
- Bertrand, I., Albertini, L., Schwartzbrod, J. (2005) Comparison of Two Target Genes for Detection and Genotyping of *Giardia lamblia* in Human Feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clin Microbiol*, 43, 5940-4.
- Bingham, A.K., Meyer, E.A. (1979) *Giardia* encystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature*, 277, 301-2.
- Boletín Epidemiología 2011. Distribución de casos nuevos de enfermedades por fuente de notificación 2011. Síntesis epidemiológica Junio 2011, 81-4.
- Bonhomme, J., Le Goff, L., Lemée, V., Gargala, G., Ballet, J.J., Favennec, L. (2011) Limitations of *tpi* and *bg* genes sub-genotyping for characterization of human *Giardia duodenalis* isolates. *Parasitol Int*, 3, 327-30.
- Boreham, P.F.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1990) Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *Int J Parasitol*, 20, 479-90.
- Buret, A.G., Mitchell, K., Muench, D.G., Scott, K.G.E. (2002) *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitol*, 125, 11-9.
- Buret, A.G. (2007) Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*, 56, 316-7.
- Cacció, S.M., Ryan, U. (2008) Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*, 2, 75-80.
- Campos, T., Vázquez, O. (1999) Reseña histórica del descubrimiento de los intrusos del arca y de sus cazadores (1ª parte). *Acta Pediátrica*, 20: 55-60.
- Carnaby, S., Katelaris, P.H., Naeem, A., Farthing, M.J.G. (1994) Genotypic heterogeneity within *Giardia lamblia* isolates demonstrated by M13 fingerprinting. *Infect Immun*, 62, 1875-80.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*, 73, 203-66.
- Cavalier-Smith, T. (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Louksozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 1741-58.

- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J.A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G. (1989) *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 83, 644-6.
- Cedillo-Rivera, R., Darvy, J.M., Enciso-Moreno, J.A., Ortega-Pierres, G., Ey, P.L. (2003) Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infect individuals in Mexico. *Parasitol Res*, 990, 119-23.
- Cedillo-Rivera, R., Leal-Yelda, A., Yépez-Mulia, L., Gómez-Delgado, A., Ortega-Pierres, G., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O. (2009) Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 80, 6-10.
- Chávez, V., González-Mariscal, L., Cedillo-Rivera, R., Martínez-Palomo, A. (1995) *Giardia lamblia*: *In vitro* cytopathic effect of human isolates. *Exp Parasitol*, 80, 133-8.
- Chen, N., Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1994) Physical map of a 2Mb chromosome of the intestinal protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Chromosome Res*, 2, 307-13.
- Chen, N., Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1995) *Giardia duodenalis* gene encoding multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitol*, 111, 423-31.
- Chen, N., Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1996) A new cysteine-rich protein-encoding gene family in *Giardia duodenalis*. *Gene*, 169, 33-8.
- Chester, A.C., Macmurray, F.G., Restifo, M.D., Mann, O. (1985) Giardiasis as a chronic disease. *Dig Dis Sci*, 30, 215-8.
- Chin, A.C., Teoh, D.A., Scott, K.G.E., Meddings, J.B., Macnaughton, W.K., Buret, A.G. (2002) Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*, 70, 3673-80.
- Cifuentes, E., Gomez, M., Blumenthal, U., Tellez-Rojo, M.M., Romieu, I., Ruiz-Palacios, G., Ruiz-Velazco, S. (2000) Risk factors for *Giardia intestinalis* infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 3, 388-92.
- Davids, B.J., Reiner, D.S., Birkeland, S.R. (2006) A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PlosOne*, 1, 44.
- Davis-Hayman, S.R., Nash, T.E. (2002) Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 122, 1-7.
- de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D., Vane, J.R. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by

- its removal in pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelin-derived relaxing factor. *Proceed Nat Aca Sci*, 85, 9797-800.
- Deselliers, L.P., Tan, D.T.M., Scott, R.B., Olson, M.E. (1997) Effects of *Giardia lamblia* infection on gastrointestinal transit and contractility in Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci*, 42, 2411-9.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 72, 431-2.
- Díaz, E., Mondragón, J., Ramírez, E., Bernal, R.M. (2003) Epidemiology and control of intestinal parasites with nitatoxanide in children in México. *Am J Trop Med Hyg*, 68, 384-5.
- Ducancel, F., Matre, V., Dupont, C., Lajeunesse, E., Wollberg, Z., Bdolah, A., Kochva, E., Boulain, J.C., Menez, A. (1993) Cloning and sequencing analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. *J Biol Chem*, 268, 3052-5.
- Ducancel, F. (2002) The sarafotoxins. *Toxicon*, 40, 1541-45.
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T.D., Hetsko, M.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F., Gillin, F.D. (2000) Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol*, 164, 1478-87.
- Eckmann, L., Gillin, F.D. (2001) Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial mucosal interactions. I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G1-G6.
- Eckmann, L. (2003) Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol*, 25, 259-70.
- Erlandesen, S.L., Bemrick, W.J., Pawley, J. (1989) High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J Parasitol*, 75, 787-97.
- Erlandsen, S.L., Macechko, P.T., van Keulen, H., Jarroll, E.L. (1996) Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J Eukaryot Microbiol*, 43, 416-29.
- Ey, P.L., Khanna, K., Andrews, R.H., Manning, P.A., Mayrhofer, G. (1992) Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Microbiol*, 138, 2629-37.
- Ey, P.L., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. (1993a) Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitol*, 106, 347-56.

- Ey, P.L., Darby, J.M., Andrews, R.H., Mayrhofer, G. (1993b) *Giardia intestinalis*: detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int J Parasitol*, 23, 591-600.
- Ey, P.L., Bruderer, T., Wehrli, C., Köler, P. (1996) Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol Res*, 82, 52-60.
- Ey, P.L., Masouri, M., Kulda, J., Nohýnková, E., Monis, P.T., Andrews, R.H., Myrhofer, G. (1997) Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukar Microbiol*, 44, 626-35.
- Fan, J.B., Korman, S.H., Cantor, C.R., Smith, C.L. (1991) *Giardia lamblia*: haploid genome size determined by pulsed field gel electrophoresis is less than 12 Mb. *Nucleic Acids Res*, 19, 1905-08.
- Favennec, L. (1991) Cytopathogenic effect of *Giardia intestinalis*, *in vitro*. *Parasitol Today*, 7, 141.
- Farthing, M.J.G., Pereira, M.E.A., Keusch, G.T. (1986) Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect Immunol*, 51, 661-7.
- Farthing, M.J.G. (1997) The Molecular pathogenesis of Giardiasis. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*, 24, 79-88.
- Faubert, G.M. (2000) Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*, 13, 35-54.
- Feely, D.E., Schollmeyer, J.V., Erlandsen, S.L. (1982) *Giardia spp.* Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol*, 563, 145-54.
- Feely, D.E., Dyer, J.K. (1987) Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J Protozool*, 34, 80-3.
- Feely, D.E., Erlandsen, S.L., Chase, D.G., Holberton, D.V. (1990) The biology of *Giardia*. In: Meyer, E.A. (Ed.), *Giardiasis*. Elsevier, Amsterdam, pp. 11–49.
- Feely, D.E., Gardner, M.D., Hardin, E.L. (1991) Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J Parasitol*, 77, 441-8.
- Filice, F.P. (1952) Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from a laboratory rat. *U California Publications in Zoology*, 57, 53-146.
- Frazén, O., Jerlström-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D.S., Palm, D., Andersson, J.A., Andersson, B., Svärd, S.G. (2009) Draft Genome Sequencing of *Giardia intestinalis* Assemblage B Isolate GS: Is Human Giardiasis Caused by Two Different Species?. *PLoS Pathogen*, 5, 1-14.

- Geurden, T., Vercruyse, V., Claerebout, E. (2009) Is *Giardia* a significant pathogen in production animals?. *Exp Parasitol*, 124, 98-106.
- Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J. (1990) Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87, 4463-67.
- Gilman, R.H., Marquis, G.S., Miranda, E., Vertegui, M., Martínez, H. (1988) Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet*, 13, 343-5.
- Goñi, P., Aldana, D.E., Clavel, A., Seral, C., Remacha, M.A., Castillo, F.J. (2010) Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B in humans in Zaragoza and León, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28, 710–12.
- Hare, D.F., Jarroll, E.L. (1989) Lind mark of proteinase activity in trophozoites. *Exp Parasitol*, 68, 168-75.
- Hehl, A.B., Marti, M. (2004) Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Mol Microbiol*, 1, 19-28.
- Hernández, P.C., Caldas, M.L., Wasserman, M. (2002) *Giardia lamblia* in vitro encystation: two dimensional electrophoresis analysis of differences in protein expression. *Biomédica*, 22, 253-62.
- Hernández, P.A., Chaparro-Olaya, A.J., Velandia, M.L., Álvarez, W.A., Pérez, P.A. (2012) Programmed cell death in protozoa: *Giardia intestinalis*'s case. *Rev Sal Bosque*, 2, 25-33
- Hill, D.R. (1993) Giardiasis. Issues in diagnostic and management. *Infect Dis Clin North Am*, 7, 503-25.
- Homan, W.L., van Enckevort, F.H.J., Limper, L., van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.L., Kasprzak, W., Majewska, A.C., van Knapen, F. (1992) Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and DNA probes. *Parasitol Res*, 78, 316-23.
- Hopkins, R.M., Constantine, C.C., Groth, D.A., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C.A. (1999) PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitol*, 118, 531-39.
- Hoque, M.E., Hope, V.T., Scragg, R., Kjellström, T., Lay-Yee, R. (2001) Nappy handing and risk of Giardiasis. *Lancet*, 357, 1017-8.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuta, Y., Mayauchi, T., Goto, K., Masaki, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Nat Aca Sci*, 86, 2863-7.

- Issac-Renton, J.L., Cordeiro, C., Sarafis, K., Shahriari, H. (1993) Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis*, 167, 431-40.
- Ivanov, I.A. (2010) *Giardia* and Giardiasis. *Bul J Vet Med*, 2, 65-80.
- Jarroll, E.L., Manning, P., Lindmark, D.G., Coggins, J.R., Erlandsen, S.L. (1989) *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol*, 32, 121-31.
- Jiménez-García, L.F., Zavala, G., Chavez-Munguia, B., Ramoz-Godinez, M.P., Lopez-Velazquez, G., Segura-Valdez, M.L., Montanez, C., Hehl, A.B., Argüello-García, R., Ortega-Pierres, G. (2008) Identification of nucleoli un the early barcnching protist *Giardia duodenalis*. *Int J Parasitol*, 38, 1297-1304.
- Kamath, K.R., Murugasu, R. (1974) A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. *Gastroenterol*, 66, 16-21.
- Katellaris, P.H., Naeem, A., Farthing, M.J. (1995) Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. *Gut*, 37, 512-8.
- Karapetyan, A. (1962) *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. *J Parasitol*, 48, 337-40.
- Keister, D.B. (1983) Axenic culture of *Giardia lamblia* in TWI-S-33 medicin supplemented with bile. *Tras R Soc Trop Med Hyg*, 77, 487-88.
- Knodler, L.A., Svärd, S.G., Silberman, J.D., Davids, B.J., Gillin, F.D. (1999) Developmental gene regulation in *Giardia lamblia*: first evidence for an encystation-specific promoter and differential 5' mRNA processing. *Mol Microbiol*, 34, 327-40.
- Kohli, A., Bushen, O.Y., Pinkerton, R.C., Houpt, E., Newman, R.D., Sears, C.L., Lima, A.A., Guerrant, R.L. (2008) *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *T R Soc Trop Med Hyg*, 102, 718-25.
- Korman, S.H., Le Blancq, S.M., Deckelbaum, R.J., Van der Ploeg, L.H. (1992) Investigation of human Giardiasis by karyotype analysis. *J Clin Invest*, 89, 1725-33.
- Lafay, B., Sharp, P.M. (1999) Synonymous codon usage variation among *Giardia lamblia* genes and isolates. *Mol Biol Evol*, 16, 1484-95.
- Lane, S., Lloyd, D. (2002) Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*, 28, 123-47.

- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., Reiner, D.S., Gillin, F.D., de Souza, W. (2003) Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. *J Struct Biol* 143: 153-63.
- Lasek-Nesselquist, E., Mark, W.D., Sogin, M.L. (2010) The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol*, 40, 1063-74.
- Le Blancq, S.M., Korman, S.H., van der Ploeg, L.H.T. (1991) Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res*, 19, 4405-12.
- Lebbad, M., Petersson, I., Karlsson, L., Botero-Kleiven, S., Andersson, J.A., Svenungsson, B., Svärd, S.G. (2011) Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Neg Trop Dis*, 8, e1262.
- Lengerich, E.J., Adiss, D.G., Juranek, D.D. (1994) Severe Giardiasis in the United States. *Clin Infect Dis*, 18, 760-3.
- Linnane, E., Roberts, R., Loocker, N. (2001) Nappies and transmission of *Giardia lamblia* between children. *Lancet*, 358; 507.
- Lo Galbo, P.R., Sampson, H.A., Buckley, R.H., Durham, N.C. (1982) Symptomatic Giardiasis in three patients with X-linked agammaglobulinemic. *J Pediatric*, 101, 78-80.
- Lohman, K.L., Langer, P.L., McMahon-Pratt, D. (1990) Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M2 of *Leishmania amazonensis*. *Proc Natl Acad Sci*, 87, 8393-7.
- López, A.B., Sener, K., Trosien, J., Jarroll, E.L., van Keulen, H. (2007) UDP-N-acetylglucosamine 4'-epimerase from the intestinal protozoan *Giardia intestinalis* lacks UDP-glucose 4'-epimerase activity. *J Eukaryot Microbiol*, 54, 154-60.
- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B., Nash, T.E. (1995) Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem*, 270, 29307-13.
- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Wu, J.J., Lu, Y., Lees, A., Chance, M.R., Nash, T.E. (1995) Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its methal-binding properties. *J Biol Chem*, 270, 13807-13.
- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Nash, T.E. (1997) Mechanism of *Giardia lamblia* differentiation into cyst. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 294-304.

- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Nash, T.E. (1998) The Molecular Mechanisms of *Giardia* Encystation. *Parasitol Today*, 11, 446-50.
- Luján, H.D. (2006) *Giardia* y Giardiosis. *Medicina*, 66, 70-4.
- Manning, P., Erlandsen, S.L., Jarroll, E.L. (1992) Carbohydrate and amino acid analyses of *Giardia muris* cysts. *J Protozool*, 39, 290-96.
- Marshall, M.M., Naumovits, D., Ortega, Y., Sterling, C. R. (1997) Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 10, 67-85.
- Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Ey, P.L., Chilton, N.B. (1995) Division of *Giardia* isolates from human into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitol*, 111, 11-7.
- Meloni, B.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C. (1988) Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from human and felines. *Am J Trop Med Hyg*, 38, 65-73.
- Meloni, B.P., Thompson, R.C.A., Hopkins, R.M., Reynoldson, J.A., Gracey, M. (1993) The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cat from aboriginal communities in the Kimberly. *Med J Austr*, 158, 157-9.
- Meyer, E.A. (1985) The Epidemiology of Giardiasis. *Parasitol Today*, 4, 101-04.
- Meyer, E.A., Radulescu, S. (1979) *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*, 17, 1-47.
- Midlej, V., Benchimol, M. (2009) *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitol Int*, 58, 72-80.
- Mineno, T., Avery, M.A. (2003) Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Curr Pharm Des*, 9, 841-55.
- Monis, P.T., Mayrhofer, G., Andrews, H.M., Homan, W.L., Limper, L., Ey, P.L. (1996) Molecular genetics analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitol*, 112, 1-12.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Mackrill, J., Kulda, J., Issac-Renton, J.L., Ey, P.L. (1998) Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitol*, 116, 7-19.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L. (1999) Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*, 16, 1135-44.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehk, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E.J., Palm, D., Passamaneck N.E., Prabhum, A., Reich, C.I., Reines, D.S., Svard, S.G., Sogin, M.L. (2007)

- Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317, 1921-6.
- Moss, D.M., Visvesvara, G.S., Mathews, H.M. (1992) Isoenzyme comparison of axenic *Giardia lamblia* strains. *Protozool*, 39, 559-64.
- Mowatt, MR., Aggarwal, A., Nash, T.E. (1991) Carboxyl-terminal sequence conservation among variant-specific surface-proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 49, 215-28.
- Mowatt, M.R., Nguyen, B.Y., Conrad, J.T., Adam, R.D., Nash, T.E. (1994) Size heterogeneity among antigenically related *Giardia lamblia* variant-specific surface proteins is due to differences in tandem repeat copy number. *Infect Immun*, 62, 1213-8.
- Mowatt, M.R., Luján, H.D., Cotton, D.B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T.E., Stibbs, H. (1995) Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol*, 15, 965-63.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51, 263-73.
- Nain, C.K., Dutt, P., Vinayak, V.K. (1991) Interactions in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*, 85, 515-22.
- Narcisi, E.M., Paulin, J.J., Fechheimer, M. (1994) Presence and localization of vinculina in *Giardia*. *J Parasitol*, 80, 468-73.
- Nash, T.E. (1997) Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Phil Trans R Soc Lond B*, 352, 1369-75.
- Nash, T.E., Keiser, D.B. (1985a) Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis*, 152, 1166-71.
- Nash, T.E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J.B., Conrad, J.D., Gillin, F.D. (1985b) Restriction-endonuclease analysis of DNA from *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Infect Dis*, 152, 64-73.
- Nash, T.E., Banks, S.M., Alling, D.W., Merritt, J.W., Conrad, J.T. (1990) Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol*, 71, 415-21.
- Nash, T.E., Mowatt, M.R. (1993) Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 90, 5489-93.
- Nash, T.E., Lujan, H.T., Mowatt, M.R., Conrad, J.T. (2001) Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect Immun*, 69, 1922-3.

- Nash, T.E. (2002) Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, 45, 585–90.
- Ortega, Y.R., Adam, R.D. (1997) *Giardia*: Overview and update. *Clin Infect Dis*, 25, 545-50.
- Otero-Negrete, J.J., Ibarra-Velarde, F., Martínez-Gordillo, M.N., Ponce-Macotela, M. (2011) Prevalencia de *Giardia intestinalis* y predominio de genotipos zoonóticos en ovinos y bovinos de traspasato de cinco estados de la República Mexicana. *Veterinaria*, 3, 219-26.
- Parenti, D.M. (1989) Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*, 160, 1076-80.
- Polis, M.A., Tuazon, C.U., Alling, D.W., Talmanis, E. (1986) Transmission of *Giardia lamblia* from a day care center to the Community. *Am J Public Health*, 76, 1142-4.
- Ponce-Macotela, M., Martínez-Gordillo, M.N., Bermúdez-Cruz, R.M., Salazar-Schettino, P.M., Ortega-Pierres, G., Ey, P.L. (2002) Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol*, 32, 1201-2.
- Prucca, C.G., Slavin, I., Quiroga, R., Elias, E.V., Rivero, F.D., Saura, A., Carranza, P.G., Lujan, H.D. (2008) Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456, 750-4.
- Que, X., Svärd, S.G., Meng, T.C., Hetsko, M.L., Aley, S.B., Gillin, F.D. (1996) Developmentally regulated transcripts and evidence of differential mRNA processing in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 81, 101-10.
- Read, M.R., Monis, P.T., Thompson, R.C.A. (2004) Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genetic Evol*, 4, 125-30.
- Ropolo, A.S., Saura, A., Carranza, P.G., Lujan, H.D. (2005) Identification of variant-specific Surface proteins in *Giardia muris* trophozoites. *Infect Immun*, 73, 5208-11.
- Rodriguez, V., Espinosa, O., Carranza, J.C., Duque, S., Arévalo, A., Clavijo, J.A., Urrea, D.F., Vallejo, G.A. (2014) Genotipos de *Giardia duodenalis* en muestras de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y de perros en Ibagué, Colombia. *Biomédica*, 34, 271-81.
- Savioly, L., Smith, H., Thompson, A. (2006) *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". *T Parasitol*, 22, 203-08.
- Sears, C.L., Kaper, J.B. (1996) Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev*, 60, 167–215.

- Singer, S.M., Elmendorf, H.G., Conrad, J.T., Nash, T.E. (2001) Biological selection of variant-specific Surface proteins in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*, 183, 119-24.
- Sogin, M.L. (1989) Evolution of eukaryotic microorganism and their small subunit ribosomal RNAs. *Am Zool*, 29, 487-99.
- Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis*, 9, 1444-52.
- Sun, C.H., Tai, J.H. (1999) Identification and characterization of a ran gene promoter in the protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, 274, 19699-706.
- Tamura, K., Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 10, 512-26.
- Tay, J., Ruiz, A., Shenone, H., Robert, I., Sánchez-Vega, J.T., Uribarren, M.A., Roero, R. (1994) Frequency of intestinal protozoois in the Mexican Republic. *Bol Chil Parasitol*, 49, 9-15.
- Taylor, D.N., Houston, R., Shlim, D.R., Bhaibulaya, M., Ungar, B.L.P., Echeverría, P. (1988) Etiology of diarrhea among travelers and foreign residents in Nepal. *JAMA*, 260, 1254-8.
- Teodorovic, S., Walls, C.D., Elmendorf, H.G. (2007) Bidirectional transcription is an inherent feature of *Giardia lamblia* promoters and contributes to an abundance of sterile antisense transcripts throughout the genome. *Nuc Ac Res*, 35, 2544-53.
- Thompson, R.C.A., Reynoldson, J.A., Mendis, A.H.W. (1993) *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*, 32, 71-160.
- Thompson, R.C.A. (2000) Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol*, 30, 1259-67.
- Thompson, R.C.A. (2004) The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. *Vet Parasitol*, 126, 15-35.
- Thompson, R.C.A. (2008) Giardiasis: modern concepts in control and management. *Ann Nestlé*, 66, 23-9.
- Thompson, R.C.A., Monis, P.T. (2004) Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol*, 58, 69-137.
- Townson, S.M., Laqua, H., Upcroft, P., Boreham, P.F.L., Upcroft, J.A. (1992) Induction of metronidazole and furazolidone resistance in *Giardia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86, 521-2.

- Tovar, J., León-Avila, G., Sutak, R., Tachezy, J., Van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., Lucocq, J.M. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur Protein maturation. *Nature*, 426, 172-6.
- Troeger, H., Epple, H.J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.D., Jelinek, T., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.D. (2007) Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56, 328–35.
- Ullu, E., Tschudi, C., Chakraborty, T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, 6, 509-19.
- Ullu, E., Lujan, H.D., Tschudi, C. (2005) Small sense and antisense RNAs derived from a telomeric retroposon family in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*, 4, 1155-7.
- Upcroft, J.A., Boreham, P.F.L., Upcroft, P. (1989) Geographic variation in *Giardia* karyotypes. *Int J Parasitol*, 19, 519–27.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P., Boreham, P.F.L. (1990) Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol*, 23, 609-16.
- Upcroft, J.A., Healey, A., Murray, D.G., Boreham, P.F.L., Upcroft, P. (1992) A gene associated with cell division and drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Parasitol*, 104, 397-405.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1993) Drug resistance and *Giardia*. *Parasitol Today*, 9, 187-90.
- Upcroft, J.A., Healey, A., Mitchell, R.W., Upcroft, P. (1994) A new rDNA repeat unit in human *Giardia*. *J Euk Microbiol*, 41, 639–42.
- Upcroft, J.A., Boreham, P.F.L., Campbell, R.W., Shepherd, R.W., Upcroft, P. (1995) Biological and genetic analysis of a longitudinal collection of *Giardia* samples derived from humans. *Acta Tropica*, 60, 35–46.
- Upcroft, J.A., Chen, N., Upcroft, P. (1996) Mapping variation in chromosome homologues of different *Giardia* strains. *Mol Biochem Parasitol*, 76, 135–43.
- Upcroft, J.A., McDonnell, P.A., Upcroft, P. (1997) Lethal *Giardia* from a wild caught sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*) established *in vitro* chronically infects mice. *Parasitol*, 114, 407–12.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1994) Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection from a single human patient. *J Euk Microbiol*, 41, 189–94.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P. (1998) My favorite cell: *Giardia*. *BioEssays*, 20, 256-63.

- Upcroft, P., Boreham, P.F.L., Upcroft, J.A. (1988) The genome of *Giardia intestinalis*. In: Advances in Giardia Research, Wallis, PM and Hammond BR (eds), University of Calgary Press, Calgary, 147-52.
- Upcroft, P., Chen, N., Upcroft, J.A. (1997) Telomeric organization of a variable and inducible toxin gene family in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Gen Res*, 7, 37-46.
- Van Keulen, H., Feely, D., Macechko, P., Jarroll, E., Erlandsen, S. (1998) The sequence of *Giardia* small subunit species *Giardia microti*. *J Parasitol*, 84, 294-300.
- Van Keulen, H. (2002) An overview of *Giardia* taxonomy: A historical perspective. En Olson BE, Olson ME, Wallis PM. *Giardia*. The cosmopolitan parasite. CAB International, Wallingford, UK.
- WHO. (1996) The World Health Report 1996. Fighting Disease Fostering Development. World Health Organization. Geneva.
- Xiao, L. (1994) *Giardia* Infection in Farm Animals. *Parasitol Today*, 10, 436-38.
- Xiao, L., Herd, R.P. (1994) Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet J*, 26, 14-7.
- Yanagisawa, M., Kiriara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T. (1988) A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nat*, 332, 411-5.
- Yang, Y., Adam, R.D. (1994) Allele-specific expression of a variant-specific surface protein (VSP) of *Giardia lamblia*. *Nuc Acid Res*, 22, 2102-08.
- Yang, Y., Adam, R.D. (1995) A group of *Giardia lamblia* variant-specific Surface protein (VSP) genes with nearly identical 5' regions. *Mol Biochem Parasitol*, 75, 69-74.
- Yee, J., Mowatt, M.R., Dennis, P.P., Nash, T.E. (2000) Transcriptional analysis of the glutamate dehydrogenase gene in the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*: Identification of a primordial gene promoter. *J Biol Chem*, 275, 11432-9.