



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL MATERIAL
NUCLEOLAR EN *GIARDIA LAMBLIA* DURANTE LA INTERFASE Y
LA DIVISIÓN CELULAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

REYNA LARA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO CÁRABEZ TREJO Y
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO.

ABRIL DE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL MATERIAL
NUCLEOLAR EN *GIARDIA LAMBLIA* DURANTE LA INTERFASE Y
LA DIVISIÓN CELULAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

REYNA LARA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO CÁRABEZ TREJO Y
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, D.F.

ABRIL DE 2016.



OFICIO FCIE/DEP/073/16

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de abril de 2015**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **LARA MARTÍNEZ REYNA** con número de cuenta **91603195** con la tesis titulada: **"ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL MATERIAL NUCLEOLAR EN GIARDIA LAMBLIA DURANTE LA INTERFASE Y LA DIVISION CELULAR"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA**:

Presidente:	DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Vocal:	DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Secretario:	DR. ABRAHAM LANDA PIFDRA
Suplente:	DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Suplente:	DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 05 de febrero de 2016

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

Unidad de Posgrado • Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas Edificio D, 1er. Piso, Circuito de Posgrados Cd. Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel. 5623 7002 <http://pebiol.posgrado.unam.mx>

Agradecimientos

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Luis Felipe Jiménez García
(Tutor Principal)

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Dr. Abraham Landa Piedra

Por su apoyo en mi formación académica, en la realización de este proyecto y todos sus comentarios por mejorarla. Gracias por sus enseñanzas y aportaciones.

Agradecimientos a Título Personal

Al jurado revisor de esta tesis por sus comentarios para mejorarla y en especial
su apoyo para concluir en tiempo:

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Dr. Abraham Landa Piedra
Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández
Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García,
Mi padre Académico y tutor principal, "mil gracias por todo el apoyo brindado
hasta la culminación de este trabajo y por la asignación de este proyecto".

A la Dra. María de Lourdes Segura Valdez
Por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Gabriel López Velázquez y al M. en C. Ignacio de la Mora de la Mora,
del Instituto Nacional de Pediatría por proporcionarme el material biológico.

Al M. en C. Marco Antonio González Jiménez
Por sus sugerencias para mejorar las metodologías realizadas. Gracias por
todas esas experiencias compartidas y la entrañable amistad.

Al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía
Por sus acertadas sugerencias y comentarios para mejorar este trabajo y por el
apoyo técnico brindado durante el aislamiento de los núcleos celulares (material
no incluido). Dr. gracias por todo a lo largo de estos años.

A la M. en C. Alicia Ochoa Sánchez
Por su apoyo técnico y asesoría durante la realización de los western blot para
proteínas SR (material no incluido).

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández
Por todo su ayuda y experiencia en la tinción AgNOR.

A la M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez
Por su asesoría para la realización de la tinción en bloque NaMaUr.

A la M. en C. Florely del Toro y el Dr. Damián Alonso Murillo,
en especial por su compañerismo y fraternal amistad, gracias por todo.

A todos mis alumnos y compañeros de trabajo por las charlas, las deliciosas comidas y todos los momentos agradables que hemos compartido y espero sigamos teniendo, pero sobre todo por ir aprendiendo juntos las malas artes de la Microscopía Electrónica. Sin mencionar nombres para no olvidar a ninguno.

Dedicatoria

Gracias a Dios por un día más y por todas las cosas que pone en mi camino.

Esta tesis está dedicada a mi familia querida, mi fuerza y fortaleza. Gracias también por el apoyo brindado en esta nueva etapa de mi vida, en especial a mi madre y mi tía.

A mi niño Daniel Solano Cordero, mi compañero de aventuras, llenaste mi vida de alegría y amor, gracias, siempre estás conmigo. Te amo mi chaparrito grandote.

A Marco Antonio Márquez, ya que juntos decidimos compartir un proyecto de vida que dio un hermoso fruto. Este logro lo comparto contigo porque has estado en cuerpo y espíritu durante su etapa final. Te amo Marco-Toño.

A mi hermosa "Valeria Montserrat", la luz de mi vida, fortaleza y estímulo para levantarme cada día. Eres el mejor regalo que me ha dado Dios. Espero que la vida me alcance para darte las herramientas necesarias para enfrentar este mundo lleno obstáculos. Te amo mi niña hermosa.

A Valeria, Daniel y Gabriel les dedico este trabajo, como ejemplo de perseverancia y esfuerzo, todo se puede si realmente lo anhelan. Espero tengan muchas aspiraciones y la fortaleza para alcanzar todos sus sueños. Ojalá Dios me permita sembrar en ustedes un granito de valores para que lleguen a ser personas honestas, trabajadoras, respetuosas y sencillas.

Mil gracias a todos.

Índice

.....	1
.....	3
Lista de figuras y tablas	11
Abreviaturas	13
Resumen	14
Abstract.....	15
1. Introducción.....	16
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo General.....	18
2.2 Objetivo Particular	18
3. Antecedentes	19
3.1 <i>Giardia</i>	19
3.1.1 Clasificación	20
3.1.2 Ciclo de Vida.....	20
3.1.3 Características Morfológicas y Biología Celular de los trofozoitos de <i>G.</i> <i>lamblia</i>	24
3.1.4 Evolución.....	30
3.1.5 Metabolismo.....	33
3.1.6 Mitosis	33
3.1.7 Citocinesis.....	35
3.1.8 Citogenética	36
3.1.9 Genoma.....	36
3.2 Ciclo Celular	36
3.3 Núcleo	39
3.3.2 Nucleogénesis.....	46
3.3.3 Características de los Cuerpos prenucleolares (PNBs)	53
4. Hipótesis.....	55
5. Relevancia e impacto del proyecto en el área de estudio.....	55
6. Metodología.....	56
6.1 Cultivos.....	56
6.2 Tinción de Plata para NORs y PNBs.....	57
6.3 Técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión (MET)...	59
6.4 Técnica para Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	59
6.5 Tinción específica <i>in situ</i> del ADN en bloque "NaMaUr"	60

7. Resultados.....	61
7.1 Los Nucléolos de <i>Giardia lamblia</i> durante la interfase.....	61
7.2 Nucléolos durante el ciclo celular con tinción de plata	63
7.3 Nucleogénesis en <i>Giardia lamblia</i> a partir de PNBs?	66
7.4 Tinción de plata en células HeLa	66
.....	69
.....	70
8. Discusión	71
9. Conclusiones	76
10. Referencias Bibliográficas.....	77

Lista de figuras y tablas

Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión coloreada de un corte sagital de *Giardia lamblia* (café y azul) anclada a las microvellosidades del intestino (amarillo).

Figura 2. El ciclo de vida de *G. lamblia*.

Figura 3. Esquema de las estructuras más visibles de *G. lamblia* (modificado de Faubert, 2000).

Figura 4. Micrografías de los distintos orgánulos encontrados en trofozoitos de *G. lamblia*.

Figura 5. Micrografía electrónica de transmisión de los núcleos de *G. lamblia*.

Figura 6. Filogenia de los eucariontes.

Figura 6. Fases del ciclo celular.

Figura 7. Esquema de la arquitectura nuclear.

Figura 8. Nucléolo de una célula HeLa observado por microscopía electrónica de transmisión.

Figura 9. Proteoma nucleolar mediante purificación e identificación por espectrometría de masas.

Figura 10. Ciclo del nucléolo en células humanas.

Figura 11. Ensamble nucleolar en células cíclicas.

Figura 12. Micrografía electrónica de transmisión de los núcleos diploides.

Figura 13. Nucléolo interfásico de *G. lamblia* observado mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando contraste uranilo-plomo.

Figura 14. DNA de núcleos interfásicos de *G. lamblia*, contrastados con la técnica de NaMaUr.

Figura 15. Micrografía electrónica de transmisión de los núcleos de *G. lamblia* teñidos con plata amoniacal.

Figura 16. Micrografías fotónicas del ciclo celular de *G. lamblia* teñido con plata amoniacal.

Figura 17. Micrografías fotónicas del transcurso de la telofase en *G. lamblia* teñidas con plata amoniacal.

Figura 18. Micrografía electrónica con tinción convencional de *G. lamblia* en anafase tardía.

Figura 19. Micrografía de fuerza atómica de una telofase.

Figura 20. Micrografías electrónicas de células HeLa en diferentes estadios de la división celular con tinción de plata.

Tabla 1. Características de las etapas de la mitosis (tomado de Jiménez-García et al., 2010).

Abreviaturas

AFM	Microscopio de Fuerza Atómica
AgNOR	Proteínas afines al Organizador Nucleolar.
ATP	Adenosin-trifosfato
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CB	Cuerpos de Cajas
CFs	Centros Fibrilares
CFD	Componente Fibrilar Denso
CG	Componente granular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
FDN	Fosas Derivadas del nucléolo
INM	Membrana nuclear interna
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MF	Microscopía Fotónica
NaOH	Hidróxido de Sodio
NL	Lámina nuclear
NPCs	Complejo de poro nuclear
NORs	Organizadores Nucleolares
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PML	Cuerpos de la oncoproteína de la leucemia promielocítica
PNBs	Cuerpos prenucleolares
Pol I	RNA Polimerasa I
PR	Región pericromosomal
pre-RNAr	Precursor de Ácido Ribonucleico ribosomal
RNA	Ácido Ribonucleico
RNPs	Ribonucleoproteínas
RNAr	Ácido Ribonucleico ribosomal
SFCs	Compartimientos de factores de splicing
snoRNAs	RNAs pequeños nucleolares
snoRNPs	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares

Resumen

El nucléolo es un orgánulo nuclear implicado en la biogénesis de ribosomas y otras funciones. Esta estructura se desensambla durante la profase y a través de la anafase y telofase se reorganiza mediante un proceso conocido como nucleogénesis, evento muy dinámico que involucra la reactivación de la transcripción del ácido desoxirribonucleico ribosomal en los organizadores nucleolares y la formación de cuerpos prenucleolar que se fusionan con los organizadores nucleolares. *Giardia lamblia* es un protozooario patógeno de divergencia temprana en la escala evolutiva de linaje ancestral, se consideró durante mucho tiempo el único eucariota sin nucléolo, sin embargo hace algunos años se describió su pequeño nucléolo. Con el fin de evaluar si la nucleogénesis también está presente en *Giardia*, se analizó la distribución de material nucleolar durante el ciclo celular y la telofase por diferentes técnicas de microscopía óptica y electrónica. Los resultados indican que en *G. lamblia*, los elementos nucleolares persisten principalmente como un compartimiento periférico intranuclear durante la telofase y todas las etapas de la división celular, pero no se detectó la existencia de cuerpos prenucleolares. Por lo tanto el material nucleolar está presente en toda la división celular incluyendo telofase, esto nos indica que la formación de cuerpos prenucleolar puede no ser necesaria para la nucleogénesis. Confirmamos que los nucléolos están presentes en los núcleos interfásicos de *Giardia* y demostramos que los nucléolos persisten a través de la división celular. La nucleogénesis en *Giardia* puede producirse por el reclutamiento de elementos nucleolares dispersos no organizados como cuerpos prenucleolares.

A b s t r a c t

The nucleolus is a nuclear organelle involved in ribosome biogenesis and other functions. This structure is disassembled during prophase and reorganizes through telophase and anaphase by a process known as nucleologenesis, is a very dynamic event that involves the reactivation of ribosomal DNA transcription in the nucleolus organizers (NORs) and the formation of prenucleolar bodies (GNPs) merging with NORs. *Giardia lamblia* is a protozoan pathogen with early divergence on the evolutionary scale of ancestral lineage, it was considered for a long time the only anucleolated eukaryote, a very small nucleolus has been recently described. In order to evaluate whether nucleologenesis is also present in *Giardia*, analyzed the distribution of nucleolar material during the cell cycle and telophase by different techniques optical and electron microscopy. Results indicate that in *G. lamblia* nucleolar elements persist mainly as an intranuclear peripheral organelle during all stages of division, including telophase, however, no prenucleolar bodies are detected in the nucleoplasm. Therefore, in the parasite, nucleolar material is present throughout cell division including telophase and formation of prenucleolar bodies may not be required for nucleologenesis.

1. Introducción

En la mayoría de los eucariontes de divergencia tardía, el RNA ribosomal (RNA_r) se genera a través de un precursor denominado pre-RNA_r, evento que ocurre en el nucléolo, la subestructura más prominente del núcleo celular y que además de encargarse de la transcripción, maduración o procesamiento del RNA_r está involucrado en el ensamble de la subunidad mayor y menor de los ribosomas, además de infinidad de funciones celulares como son: control del envejecimiento celular (Rosete et al., 2007), biogénesis de múltiples ribonucleoproteínas (RNPs), control del ciclo celular, apoptosis, replicación y reparación del DNA consistente con un rol para el nucléolo en vínculo con la biosíntesis de ribosomas, progreso del ciclo celular y señalización durante el estrés (Boulon et al., 2010).

El nucléolo está formado por tres distintos componentes morfológicos y bioquímicamente diferentes: los centros fibrilares (CF) –lugar donde se realiza la transcripción del pre-RNA_r– que están rodeados por el componente fibrilar denso (CFD) –donde se lleva a cabo el procesamiento del pre-RNA_r– y el componente granular (CG) –región donde se ensamblan las subunidades del ribosoma–irradia hacia afuera del CFD (Dundr y Misteli, 2001; Boulon et al., 2010).

Muchos de los aspectos de la organización nucleolar y su función se conservan dentro de los organismos eucariontes, desde las levaduras hasta los seres humanos (Kressler et al., 2010). En el caso de las células de mamíferos los nucléolos se desensamblan cuando la célula se divide debido a que la síntesis de RNA_r se apaga por la fosforilación de factores nucleolares específicos y se reensamblan al final de la mitosis, alrededor de los cúmulos repetidos en tándem

de los genes de DNA ribosomal (DNAr) conocidos como regiones organizadoras del nucléolo (NORs) (Dimario, 2004; Leung et al., 2004; Olson y Dunder, 2005; Bártoová et al., 2010; Boulon et al., 2010).

La reorganización del nucléolo es un evento conocido como nucleogénesis, es un proceso muy dinámico que se inicia durante la anafase tardía y la telofase temprana de la mayoría de los eucariontes. La nucleogénesis inicia cuando se activa la transcripción de los genes ribosomales a través de la RNA polimerasa I (Pol I), posteriormente los NORs se fusionan con los cuerpos prenucleolares (PNBs). Estas estructuras van aumentando su tamaño conforme se fusionan hasta ensamblar todos los componentes nucleolares y reformar un nucléolo completo (Giménez-Martín et al., 1977; De la Torre y Giménez-Martín, 1982; Ochs et al., 1985; Jiménez-García et al., 1989; Smetana et al., 1999).

La mayor parte del conocimiento actual sobre la formación, composición y la multifuncionalidad del nucléolo proviene principalmente de células de plantas y animales. Sin embargo, en eucariontes de divergencia tardía que ensamblan estructuras nucleolares bien definidas, el conocimiento sobre el nucléolo aún no es completo, tal es el caso de *Giardia lamblia* un protozooario patógeno que pertenece al grupo de los protistas, organismos unicelulares de divergencia temprana en la escala evolutiva y por lo tanto considerados eucariontes de linaje ancestral, que presenta mitosis semi-abierta y recientemente se identificó el nucléolo en trofozoitos con sus respectivos componentes granular, fibrilar denso y fibrilar (Jiménez García et al., 2008). En este trabajo se describen el nucléolo de *G. lamblia* durante la mitosis utilizando la técnica de plata, tanto para microscopía fotónica (MF) como para microscopía electrónica de transmisión (MET).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

- Conocer si se presenta el proceso de nucleogénesis en *Giardia lamblia*.

2.2 Objetivo Particular

- Estudiar si el material nucleolar en *Giardia lamblia* se origina a través de la nucleogénesis en telofase.

3. Antecedentes

3.1 *Giardia*

Giardia lamblia, *duodenalis* o *intestinalis* fue visualizado por primera vez por von Leeuwenhoek en 1681 (revisado en Ghosh et al., 2001); es un protista que parasita el duodeno y el yeyuno proximal de 40 diferentes especies de mamíferos (Upcroft y Upcroft, 1998), convirtiéndose en la principal fuente de infecciones en seres humanos y tener potencial como agente bioterrorista, ya que es considerado un patógeno categoría B por ser moderadamente fácil de diseminar y tener bajos índices de mortalidad. Debido a que la giardiasis se transmite por contaminación fecal-oral, la prevalencia es mayor en poblaciones con condiciones sanitarias deficientes, el contacto cercano y las prácticas sexuales orales y anales. La enfermedad es comúnmente transmitida por el agua debido a que *Giardia* es resistente a los niveles de cloro en el agua del grifo normal y sobrevive bien en las corrientes frías de montaña. Debido a que la giardiasis con frecuencia infecta a las personas que pasan mucho tiempo de campamento, excursionismo o cazando, se ha ganado los apodosos de "diarrea del mochilero" y "fiebre del castor" (Aurrecoechea et al., 2009).

La ingesta de este parásito anaerobio causa severos cuadros diarreicos principalmente a niños, pudiendo provocar hasta su muerte (Adam, 2001). Cerca de 280 millones de personas al año sufren giardiasis por ello se ha incluido como parte de la Iniciativa de Enfermedades Olvidadas (WHO) desde 2004 (Lane y Lloyd, 2002; revisado en Ankarkev et al., 2010).

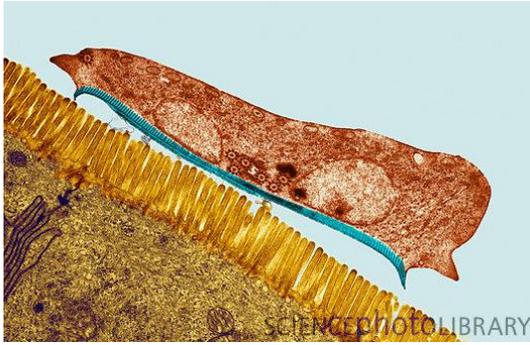


Figura 1. Micrografía electrónica de Transmisión coloreada de un corte sagital de *Giardia lamblia* (café y azul) anclada a las microvellosidades del intestino (amarillo). Tomada de: http://www.sciencephoto.com/image/364903/530wm/Z1000192-Giardia_lamblia_protozoan,_TEM-SPL.jpg

3.1.1 Clasificación

Levine en 1980 la clasificó de la siguiente forma:

Superreino	Eucarionte (Stainer, 1941).
Reino	Protista (Haechel, 1866).
Subreino	Protozoa (Golfus, 1867)
Phylum	Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963).
Subphylum	Mastigophora (Diesing, 1866).
Clase	Zoomastigophora (Calkins, 1909).
Orden	Diplomonadida (Wenyon, 1926) (Brugerolle, 1977).
Familia	Hexamitidae (Kent, 1880).
Género	<i>Giardia</i>
Especie	<i>G. lamblia, intestinalis o duodenalis</i>

3.1.2 Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *G. lamblia* incluye dos formas de desarrollo en su ciclo de vida: quistes (fase infectiva o de resistencia) y trofozoitos (fase vegetativa o patógena) (Adam, 2001; Figura 1 y 2).

La infección del huésped se inicia con la ingesta de quistes a través de agua o alimentos contaminados con residuos fecales. Los quistes se fijan a nivel del

duodeno y para que el desenquistamiento o excistación ocurra, se requieren la exposición del quiste al pH ácido del estómago (1.3 a 2.7), seguida de solución alcalina que contienen proteasas pancreáticas del intestino delgado (Adam, 2001; Ankarklev et al., 2010).

Debido a que la giardiasis se transmite por contaminación fecal-oral, la prevalencia es mayor en poblaciones con condiciones sanitarias deficientes, el contacto cercano, y las prácticas sexuales orales y anales. La enfermedad es comúnmente transmitida por el agua debido a que *Giardia* es resistente a los niveles de cloro en el agua del grifo normal y sobrevive bien en las corrientes

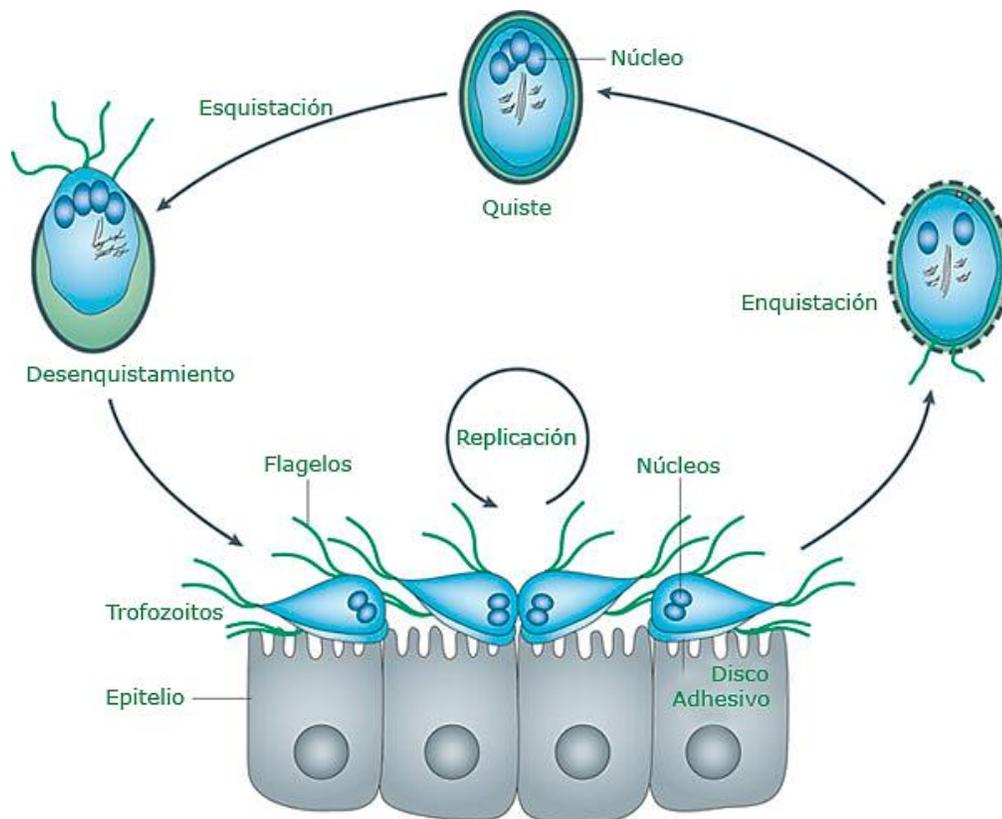


Figura 2. El ciclo de vida de *G. lamblia*. Dentro del huésped inicia con la ingesta de quistes a través de agua o alimentos contaminados, una vez que llegan yeyuno se desenquistan y emergen los trofozoitos que se replican por fisión binaria, llegando al íleon terminal inicia el enquistamiento. Quistes y trofozoitos pueden salir al ambiente a través de las heces, pero sólo los quistes sobrevivirán. Modificada de Ankarklev *et al.*, 2010.

frías de montaña (Ankarklev et al., 2010).

Una vez que el parásito emerge como trofozoito y adquirió flexibilidad y movilidad, se alberga en el borde de los enterocitos que cubren las vellosidades del intestino delgado proximal, sitio donde se realizan los procesos de digestión y absorción de nutrientes. La fisiopatología de la diarrea de *Giardia lamblia* se presenta de 6-15 días después de la ingestión de quistes y consiste en la disminución de la absorción intestinal por daño en los enterocitos (Adam, 2001; Portugal-Ramírez et al., 2005, Ankarklev et al., 2010). Este daño provoca reducción de la actividad lactásica, lo cual condiciona a una mala absorción de disacáridos y en consecuencia la formación de excreciones líquidas, voluminosas, acompañadas de vómitos, distensión y cólicos abdominales, flatulencia y eritema perianal. Algunos pacientes también pueden cursar escalofríos y fiebre de baja intensidad (Portugal-Ramírez et al., 2005).

Generalmente la microbiota intestinal mantienen la resistencia a la colonización, sin embargo, *Giardia* empieza a utilizar y secuestrar nutrientes como la bilis, la arginina y el zinc con el fin de sobrevivir y reproducirse, evadiendo las defensas del huésped y la microbiota. Los flagelos y el disco ventral son estructuras de los trofozoitos que le permiten movilidad y adherencia en las células epiteliales intestinales. *Giardia* utiliza factores de virulencia funcionales para evadir las respuestas del huésped a través de la producción inflamatoria antioxidante, la escisión de la interleucina-8, la disminución de la arginina vía arginina deiminasa, y cambios en la expresión de variantes de la proteína de superficie. Los efectos de *Giardia* en las células epiteliales (como son el arresto del ciclo celular, la proliferación alterada, interrupción de las uniones celulares y apoptosis) pueden depender de la cepa de forma directa o indirecta. Los sucesivos cambios en la disponibilidad de nutrientes, la composición de la microbiota, las defensas

antiinflamatorias y los sitios de unión de patógenos de células epiteliales pueden alterar secundariamente manifestaciones de la enfermedad de enteropatógenos coinfectantes. La respuesta inmune de la mucosa es redundante, promueve la eliminación temprana de *Giardia* (absorción de nutrientes por las células epiteliales, mantenimiento de la función de barrera y moléculas pro-inflamatorias; interleucina-6 derivadas de células dendríticas y células cebadas; y células CD4, CD-8 y T) y retardan la enfermedad (células de memoria-T CD-4 y células B). Las células-T CD-4 inducen la respuesta de memoria contribuyendo a la inflamación crónica y promueven la deficiencia de disacáridos. Las células T CD-8 median la apoptosis, el acortamiento de microvellosidades y la deficiencia de disacáridos. Los daños en las células epiteliales pueden persistir más allá de la eliminación del parásito, lo que permite la translocación sostenida de la microbiota y productos microbianos. La alteración de la homeostasis y la inflamación de la mucosa pueden obstaculizar aún más la absorción de los nutrientes y contribuir a secuelas prolongadas, incluyendo alteraciones en el crecimiento y el desarrollo cognitivo (Bartelt y Sartor, 2015).

El enquistamiento de los trofozoitos se inicia en el íleon terminal y continúa en el colon, la ausencia de colesterol permite el inicio del proceso el cual altera la permeabilidad de las membranas de los trofozoitos y directa o indirectamente se pueden activar una serie de mecanismos de transducción que culminan en la expresión de los genes específicos de la enquistación.

Debido a que la giardiasis con frecuencia infecta a personas que pasan mucho tiempo de camping, excursionismo, o de cacería, ha ganado los apodos de "diarrea del mochilero" y "fiebre del castor" (Kucik, et al., 2004). En México, se calcula que hay 9 millones de personas parasitadas por *Giardia lamblia*, siendo

esta protozoosis la causa más común de parasitosis intestinal (revisado en Vásquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009) principalmente en niños.

3.1.3 Características Morfológicas y Biología Celular de los trofozoitos de *G. lamblia*

Los trofozoitos miden de 10 a 12 μm de longitud, de 5 a 7 μm de ancho y de 1 a 2 μm de espesor; son piriformes, con un polo anterior redondeado y otro posterior afilado, su aspecto de cara sonriente formada por los dos núcleos en el tercio anterior (ojos), los axonemas que pasan en sentido longitudinal entre los núcleos (nariz) y cuerpos medios (boca) situados en sentido transversal en el tercio posterior y se completa con cuatro pares de flagelos (Figura 3). Presenta una simetría bilateral completa y se divide por fisión binaria. Su región dorsal es convexa y la ventral cóncava, lugar donde se encuentra el axostilo, dos núcleos anteriores, el disco de succión o disco ventral ocupa de \sim a l de la superficie ventral, los corpúsculos parabasales y cuatro pares de flagelos (dos laterales, uno ventral y otro caudal). Esta forma vegetativa rara vez se encuentra en las heces, y si lo hace, al ser extremadamente lábil no sobrevive en el medio ambiente. Este protozooario también presenta otras estructuras como son: mitosomas, vacuolas lisosómicas, cuerpos medios, etc. (Adam, 1991, 2001).

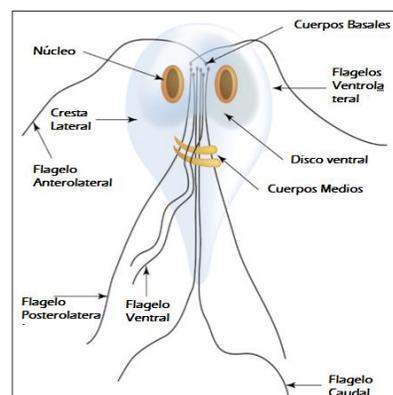


Figura 3. Esquema de las estructuras más visibles de *G. lamblia* (Modificado de Faubert, 2000).

DISCO VENTRAL. Cada trofozoito (figura 4a) tiene un disco ventral el cual es una estructura cóncava del citoesqueleto rodeada por una membrana plasmática, con tres características distintas: microtúbulos que se enrollan alrededor de un área desnuda; microcintas que sobresalen en el citoplasma y puentes cruzados que conectan los microtúbulos adyacentes (Elmendorf et al., 2003). Generalmente tres familias de genes de giardinas (proteínas específicas de superficie de *Giardia*) se localizan en el disco ventral, incluyendo: (i) las anexinas (es decir, α -giardinas) que se localizan en los bordes exteriores de las microcintas; (ii) fibras de ensamble estriadas como β -Giardina, que están estrechamente asociadas a los microtúbulos y δ -Giardina que es una proteína de las microcintas (Elmendorf et al., 2003). La función básica del disco ventral es semejante a la de una ventosa para la succión, adhesión o anclaje a las vellosidades de los enterocitos (figura. 4b) (Holberton, 1973; Adam, 2001). Se ubica en la región ventral y tiene una profundidad máxima de 0.4 μm . Esta estructura se cierra hacia los extremos formando una cresta lateral que es la única zona del disco que tiene interacción física con la célula blanco o las superficies adherentes, por lo que parece ser el órgano más importante para el enlace con la mucosa intestinal del hospedero (Rivera et al., 2002). Contiene lectinas, tubulina, giardina, proteínas contráctiles, actina, miosina y tropomiosina, proteínas que constituyen la base bioquímica para la contracción del disco (Crossley et al., 1993).

FUNIS. El funis es una estructura localizada en el extremo posterior de los trofozoitos, sin embargo pobremente estudiada y está compuesta de microtúbulos que se extienden entre los flagelos caudales y las barras flagelares posterior-lateral (Benchimol et al., 2004).

FLAGELOS. Los trofozoitos presentan ocho flagelos dispuestos en 4 pares simétricos: 2 anterolaterales, 2 posterolaterales, 2 ventrales y 2 caudales, los cuales son importantes para su desplazamiento (figura 4c) y están compuestos de tripletes de microtúbulos en un arreglo 9+2 (revisado en Ghosh, 2001; figura 3). Cada flagelo se ancla a un cuerpo basal (centrosoma) y deja el cuerpo de la célula en un locus diferente. La video microscopía en secuencia sugiere que cada par de flagelos tiene una función diferente (Nohynková et al., 2006). Las partes intracelulares de los flagelos anterior, posterior-lateral y los pares caudales están acompañados por barras densas de paraflagelos, cuya composición proteica es sensible a señales ambientales (Abel et al., 2001; Gibson et al., 2006; Lauwaet et al., 2007).

CUERPOS MEDIOS. Son un par de estructuras en forma de uña de martillo o garra, por su morfología son utilizadas para diferenciar especies de *Giardia*. Estas estructuras se ubican en la línea media del trofozoito y en posición dorsal al flagelo caudal. Sus movimientos en espiral dan la impresión de una hoja de árbol que cae (Cordero, 1999). El cuerpo medio es un saco sin membranas asociado a microtúbulos en el centro del cuerpo celular del trofozoito (Piva y Benchimol, 2004). Su función exacta se desconoce, pero se les ha asociado con las siguientes funciones: división celular, reserva de lipoproteínas relacionadas con la construcción del disco adhesivo en las células hijas y soporte de la región terminal, donde no hay disco adhesivo (Vásquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009).

MITOSOMAS. *Giardia* carece de mitocondrias como tal pero sí posee estructuras similares llamadas mitosomas donde se han identificado proteínas encargadas de la biosíntesis de enzimas con sitios catalíticos [Fe-S], que son importantes en el metabolismo energético de organismos amitocondriales (p.e. PFOR, Fd, hidrogenasa, etc.). Como es el caso de la desulfurada de cisterna

(IscS), la cual filogenéticamente se ubica dentro de las mitocondrias (Regoes et al., 2005; figura 4d).

RETICULO ENDOPLÁSMICO. *G. lamblia* no presenta retículo endoplásmico (RE) liso, pero sí rugoso. Su RE rugoso se caracteriza por la presencia de la proteína Bip Giardial que es homóloga a hsp70, la cual reside en el lumen del RE en eucariontes de divergencia tardía. Bip Giardial es una molécula chaperona útil al plegamiento de proteínas y la translocación de proteínas a través de la membrana del RE (Craig et al., 1993; Soltys et al., 1996). Bip Giardial contiene el clásico carboxilo terminal KDEL, que es una señal de retención dentro del RE, por ello se piensa en la probable existencia de un complejo de Golgi. Ultraestructuralmente, el RE rugoso de *Giardia* se caracteriza por ser un sistema endomembranoso extenso con morfología y distribución subcelular semejante a los eucariontes de divergencia tardía, con estructura tubular mayor a 3 μm de longitud y ribosomas adosados a su membrana (Soltys et al., 1996).

NÚCLEOS. Los trofozoitos tienen dos núcleos idénticos de forma ovoide, ligados al retículo endoplásmico, bilateralmente simétricos, con la misma cantidad de DNA según estudios de hibridación *in situ* y transcripcionalmente activos basándose en la incorporación de uridina tritiada (figura 5a; Kabnick y Peattie, 1990; Carranza y Lujan, 2010). Estos núcleos están anclados a los cuerpos basales de los flagelos anteriores y pueden ir descendiendo por los flagelos posterior lateral y ventral, durante la división celular (Benchimol, 2005). Cada núcleo presenta un nucléolo, descrito recientemente, el cual está formado por un componente granular, centros fibrilares y un componente fibrilar denso (Jiménez-García et al., 2008; figura 5b). Cada núcleo tiene una copia del genoma y se replican casi al mismo tiempo de forma similar durante la citocinesis como lo demostraron los estudios usando FISH (Wieseahn et al., 1984; Yu et al., 2002).

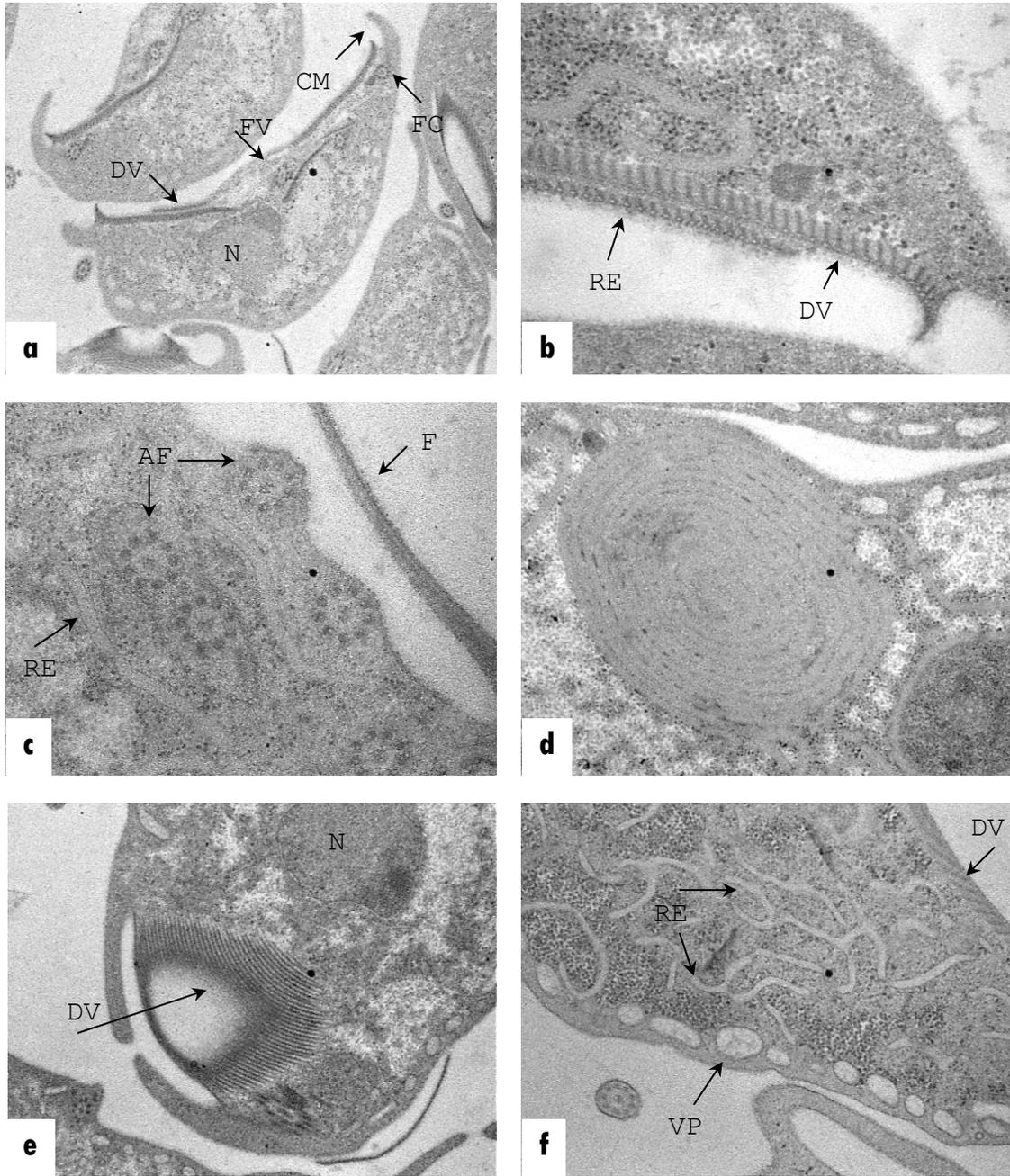


Figura 4. Micrografías de los distintos organelos encontrados en trofozoitos de *Giardia lamblia*. a) Trofozoito; b) disco ventral; c) axonemas de flagelos ventrales, d) mitosoma; e) trofozoito en proceso de citocinesis, f) retículo endoplásmico. N, núcleo; DV, disco ventral; FV axonemas de flagelos ventrales, FC, axonema de flagelo caudal; RE, retículo endoplásmico; VP, vacuolas periféricas.

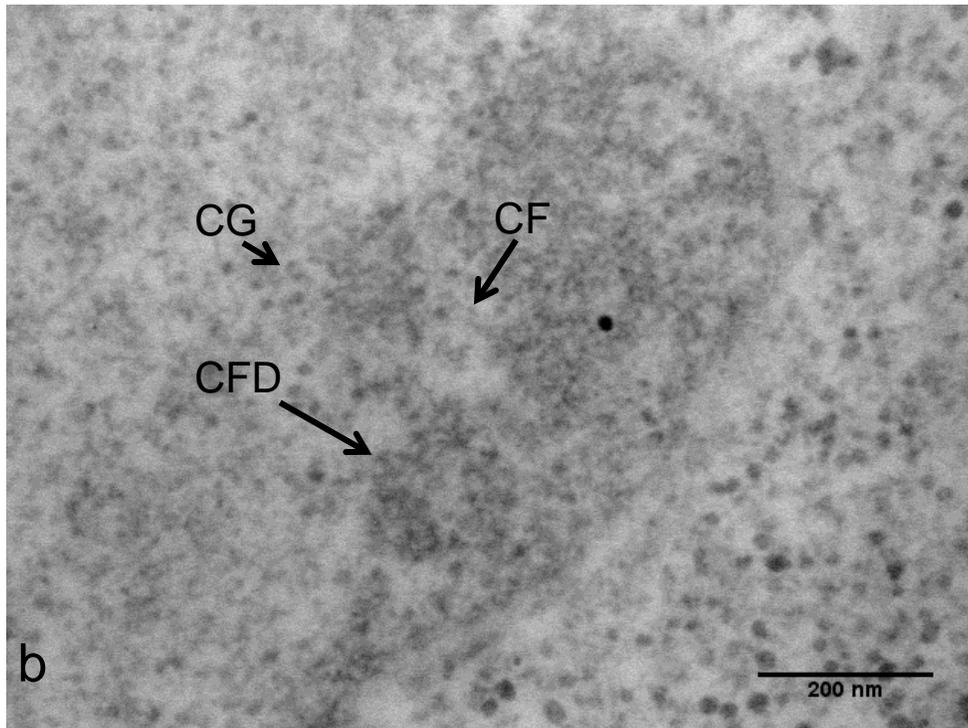
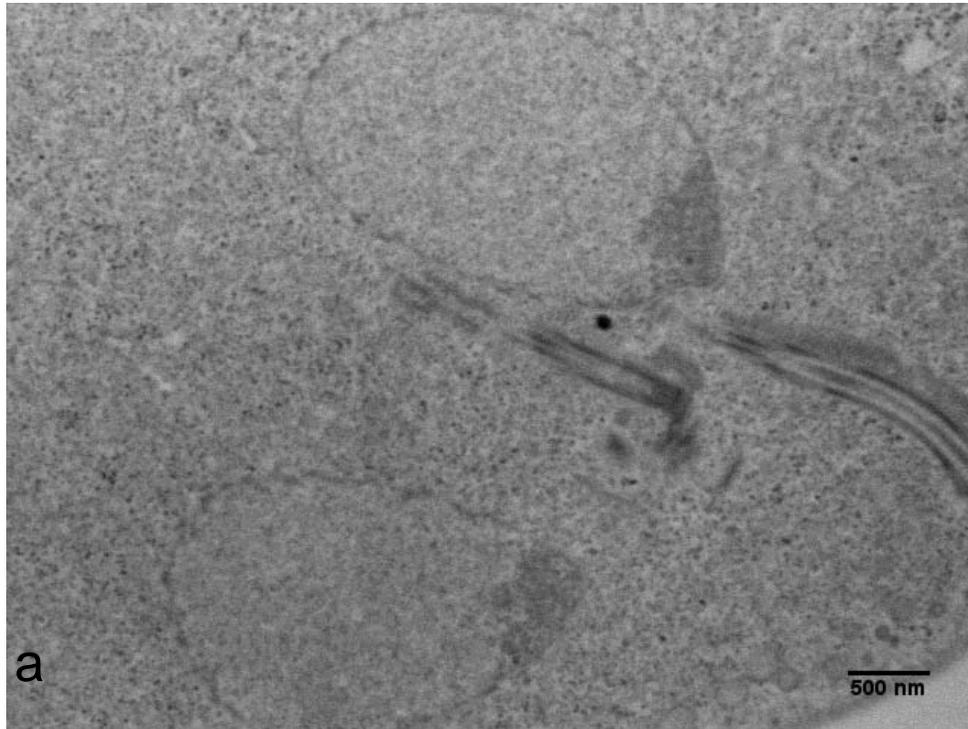


Figura 5. Micrografía electrónica de los núcleos de *G. lamblia*. a) Se observa el par de núcleos anclados al citoesqueleto de los flagelos. b) Cada uno de los nucléolos se ubica en los polos de los núcleos y se reconocen las tres regiones morfológicamente diferentes: componente granular (CG) y componente fibrilar denso (CFD) y centros fibrilares (CF).

Sin embargo, localizaron el RNA pequeño nucleolar (snoRNA) G1sR17 en sólo un nucleólo, lo cual causó sorpresa. Se han identificado 20 snoRNAs pero no está ubicada su localización (Yang et al., 2005). También se han descrito diferencias en el número de cromosomas (Tumová et al., 2007), así como una discrepancia en el número de poros nucleares (Benchimol, 2004a) entre ambos núcleos, aunque el número de poros nucleares se ha correlacionado con la actividad transcripcional en otros eucariontes. En el caso de *Giardia* se sugiere que uno de los dos núcleos puede tener mayor actividad transcripcional que el otro. Es posible que uno de los dos núcleos pueda ser responsable de la producción y exportación de algunos o todos los snoRNAs.

OTROS ORGANELLOS. Alberga estructuras como vacuolas lisosómicas, ribosomas y depósitos de glucógeno, también presenta aparato de Golgi en trofozoítos en proceso de enquistamiento y un complejo citoesqueleto (Adam, 2001).

3.1.4 Evolución

G. lamblia es considerado entre los organismos eucariotas el más primitivo basándose en el análisis del RNA de la unidad ribosomal 16S (Sogin et al., 1989; Leipe et al., 1993). Dado que la divergencia de *Giardia lamblia* se encuentra cerca de la transición entre procariontes y eucariontes en la filogenia universal de RNA ribosomal, es un valioso, aunque no único, modelo para comprender las innovaciones genéticas que dieron lugar a la formación de las células eucariontes. En términos evolutivos, la divergencia de este organismo es por lo menos dos veces más antigua que la del ancestro común de la levadura y el hombre.

Giardia es miembro de los Diplomonados, además de *Spironucleus*, *Trepomonas* y *Hexamita* los cuales son considerados dentro de uno de los linajes más divergentes de los eucariontes. Se les describe como “fósiles biológicos”, por tener muchas peculiaridades (incluyendo dos núcleos, un código genético diferente y una carencia de mitocondrias) y también retienen propiedades de bacterias y arqueas. Sin embargo, los avances en genómica, filogenia molecular y biología celular durante la última década sugieren fuertemente que este punto de vista es incorrecto. La interpretación actual de la filogenia de los eucariontes no sugiere que los diplomonados sean el primer brazo de los eucariontes de divergencia temprana. Los diplomonados tienen un grupo hermano relacionado con los parabasalidos, y estos dos grupos son ahora clasificados en el supergrupo eucariótico de los Excavata, por ser un grupo de flagelados binucleados que se encuentran en ambientes anaerobios o microaerofílicos. Por otra parte, los diplomonados parecen tener todas las características que antes se consideraban faltar en estos eucariontes primitivos, incluyendo mitosomas (son organelos con ancestría mitocondrial; Tovar et al., 2003), genes que contienen intrones (Nixon et al., 2002) y nucléolo (Jiménez-García et al., 2008). Las propiedades bacterianas de estos organismos (Por ejemplo, las vías metabólicas) son probablemente el resultado de transferencia lateral de genes (Morrison et al., 2007; Andersson et al., 2007). La variación genética y biológica existe en diplomonados. Por ejemplo, el género *Spironucleus*, *Trepomonas* y *Hexamita* forma un clado monofilético que excluye al género *Giardia* en el árbol filogenético, y especies de estos tres géneros usan un código genético alternativo (Andersson et al., 2007) en el cual TAA y TAG codifican glutamina en lugar de ser los codones de término.

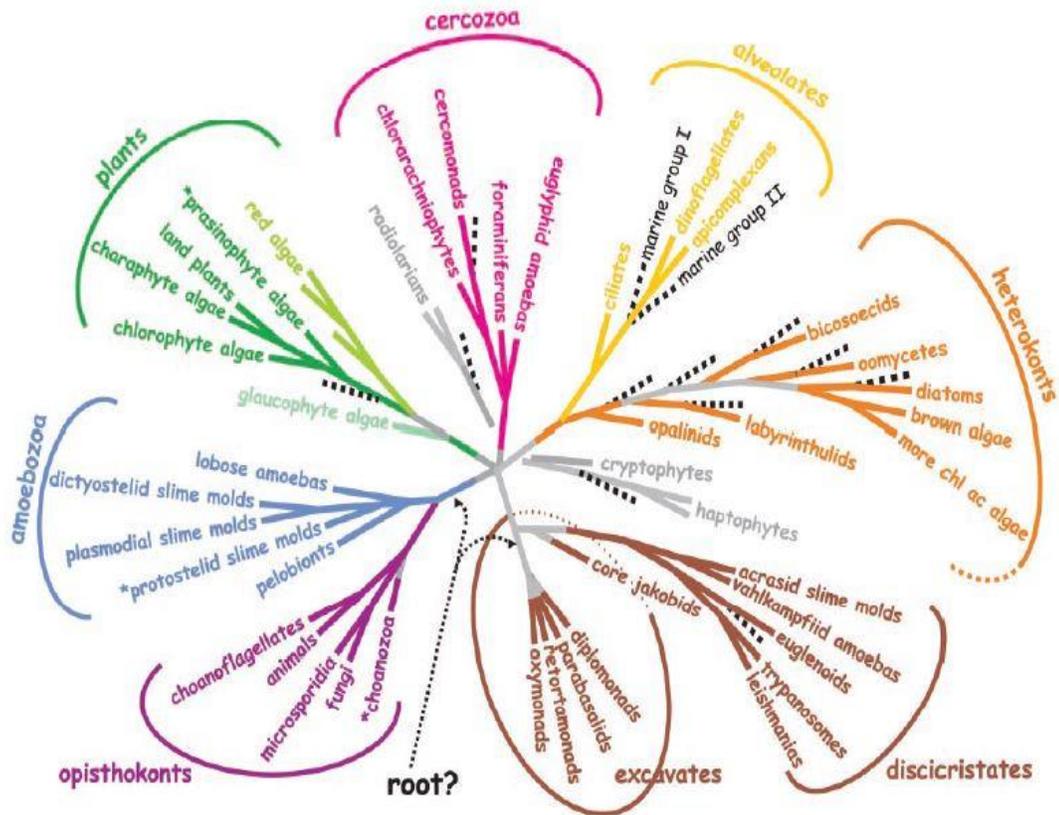


Figura 6. Filogenia de los eucariontes. El árbol que se muestra se basa en un consenso de datos moleculares y estructurales e incluye indicaciones aproximadas de nuevos taxos por ciPCR (líneas negras). La mayoría de los eucariontes caracterizados, con excepción de los subgrupos de amibas, se pueden asignar a uno de los ocho principales grupos. Los opisthokonts (flagelo basal) tienen un flagelo basal sencillo en las células reproductivas y crestas mitocondriales planas (en la mayoría de los eucariontes son tubulares). Los eucariontes fotosintéticos se originaron en plantas; ellos son los únicos plastidos con sólo dos membranas externas. Heterokonta (flagelos diferentes) tienen un flagelo anterior cubierto con pelos tripartidos y generalmente otro en segundo plano. Los Cercozoa son amibas con pseudópodos, que a menudo viven dentro de las (capas externas duras), algunos son muy elaborados (foraminíferos). Amoebozoa son comúnmente llamadas amibas, a menudo con pseudópodos lobosos por lo menos parte de su ciclo de vida. Alveolares tienen sistema de alvéolos corticales debajo de sus membranas plasmáticas. Discicristates tienen crestas mitocondriales en forma de disco y, en algunos casos, una abertura ventral profunda de alimentación. Excavatas sin mitocondrias, carecen de filogenética molecular substancial, pero la mayoría tienen una abertura ventral de alimentación y todos carecen de mitocondrias. Un asterisco antes del nombre indica un probable taxón parafilético. Tomado de Baldauf, 2003.

3.1.5 Metabolismo

Giardia lamblia tiene características aeróbicas y anaeróbicas, respira en presencia de oxígeno y se considera un organismo aerotolerante o microaerofílico. En su respiración no produce hidrógeno molecular. Presenta una respiración endógena estimulada por la glucosa; su metabolismo está basado en la glucólisis que conduce a la producción de acetato, etanol, alanina y CO₂. Cataboliza la asparagina mediante la dihidrolasa de la arginina con la producción de adenosin-trifosfato (ATP; Stadelmann et al., 2012). Es incapaz de sintetizar colesterol, sin embargo, tiene la capacidad de sintetizar farnesilo y geranylgeranilo en isoprenilato proteínas. Asimismo, *Giardia* es incapaz de sintetizar purinas y pirimidinas y tiene la necesidad de recuperarlas del lumen intestinal. La detección de varias enzimas que participan en las vías metabólicas de los carbohidratos demuestra que el metabolismo energético de este protozoo es fermentativo.

Giardia lamblia no realiza ciclo de Krebs, ya que carece de mitocondrias y de enzimas mitocondriales, no hay citocromos, ni evidencia de fosforilación oxidante.

3.1.6 Mitosis

Este protista presenta mitosis semi-abierta con dos husos mitóticos extranucleares que tienen acceso a la cromatina a través de aberturas polares en las membranas nucleares. Su mitosis es similar a la de otras células eucariotas, conserva etapas del ciclo celular típicas como son: interfase, profase, metafase, anafase y telofase.

Interfase. Los trofozoitos tienen un citoesqueleto que consta de 4 estructuras microtubulares: el disco ventral, los axonemas flagelares con sus cuerpos basales, el funis y el cuerpo medio. La cromatina está descondensada y contiene la histona cenH3, una variante de la histona H3, localizada en los loci centroméricos de los cromosomas. Los cuerpos basales de cada flagelo se localizan entre los núcleos adyacentes en la región anterior de la célula.

Profase. Se caracteriza por la condensación de la cromatina y la nucleación de los microtúbulos del huso, es decir que los microtúbulos primero aparecen entre los dos núcleos cerca de los cuerpos basales de los flagelos y se extienden alrededor de cada núcleo individualmente. Los cromosomas de cada núcleo poseen un locus centromérico conteniendo a la proteína cenH3. Los dos núcleos migran a una posición media de la célula a lo largo del eje dorsal-ventral, el núcleo de la posición ventral ligeramente anterior al núcleo en posición dorsal lo que les permite cierta separación.

Metafase. Los núcleos completan su migración quedando en el plano dorsal-ventral y están rodeados por los microtúbulos que forman dos husos bipolares independientes. Los polos opuestos de cada huso se orientan a lo largo del eje izquierda-derecha de la célula. La cromatina se condensa fuertemente en el centro del eje de cada huso, tanto que no se aprecian individualmente los cromosomas.

Anafase A y B. Los cromosomas de cada núcleo se segregan en dos etapas, en la anafase A se separan las cromátidas hacia los polos de los husos y en la anafase B los husos se elongan a lo largo del eje izquierda-derecha de las células. La anafase A inicia primero en un núcleo y la anafase B se produce simultáneamente en ambos núcleos. Al final de la anafase, los núcleos de origen

progenitor residen en lados opuestos de las células hijas, es decir el núcleo de lado dorsal permanece del lado dorsal, mientras que el de lado posterior aparece del lado ventral en la célula hija.

Telofase. En telofase, muchos microtúbulos se extienden entre los núcleos de cada lado de la célula reemplazando los arreglos de los husos bipolares. Los núcleos telofásicos hijos mantienen los centrómeros agrupados y se mueven cerca de la periferia de la célula como lo hacían en la interfase. Durante la citocinesis, el DNA se descondensa, los centrómeros se dispersan en el núcleo y las estructuras del citoesqueleto se regeneran. Para completar la división de las células, se inicia un surco en el extremo anterior creando una célula con forma de corazón y 4 núcleos. El surco crece en ambos extremos en el plano longitudinal, separando las células izquierda y derecha para obtener a las dos células hijas (revisado en Sagolla et al., 2006).

3.1.7 Citocinesis

Giardia se divide de tres formas distintas: 1) ventral-ventral, donde el disco ventral se va abriendo hasta observarse dos discos encontrados; 2) dorsal-dorsal, los discos ventrales se encuentran en direcciones opuestas (orienteponiente) y 3) ventral-dorsal. *G. lamblia* presentan división con simetría de imagen de espejo principalmente en los modos ventral-ventral o dorsal-dorsal, de modo que el núcleo derecho de la madre se convierte en el núcleo izquierdo de la hija. Cuando se divide en forma ventral-ventral ambas células se sueltan y nadan libremente en el medio de cultivo, mientras que en los otros dos modos, una célula se queda adherida del sustrato mientras que la otra célula nada libremente en el medio de cultivo (Benchimol, 2004b; Tůmová et al., 2007).

3.1.8 Citogenética

G. lamblia posee cinco pares de cromosomas en cada núcleo, de aproximadamente 0.64 - 0.94 μm de longitud, con una media de 0.76 μm , tienen una breve forma de varilla, generalmente dispuestos en pares, por lo tanto su número de cromosomas es $2n=10$. El par 1 de cromosomas es submetacéntrico mientras que los pares 2 a 5 son telocéntricos según observaciones por microscopía electrónica de Barrido, por lo tanto la fórmula de cariotipo es $2n = 10 = 2sm + 8t$. Aunque previamente se había descrito que *G. lamblia* tenía núcleos haploides, posteriormente se describió que posee núcleos diploides, y se cree que la haploidia reportada se debió al uso de albendazol para la sincronización de los cultivos (Túmova et al., 2007; Shen et al., 2011), pero actualmente está la disputa entre haploidia y diploidía (Túmova et al., 2016).

3.1.9 Genoma

Giardia lamblia posee un pequeño genoma diploide de entre 11.7 y 12 Mb (Morrison et al., 2007; Arrecochea et al., 2009) y ha sido depositado en el GenBank (<http://GiardiaDB.org>). Presenta arreglos teloméricos de los genes DNAr, repetidos subteloméricos y recombinaciones. El proyecto Genoma de *Giardia* actualmente se ha concluido, el análisis de la información obtenida promete realizar aportaciones acerca de los orígenes de la organización del genoma nuclear y las vías metabólicas usadas por estos protistas parásitos.

3.2 Ciclo Celular

La reproducción no es un proceso continuo, sin embargo, la mayoría de las células se dividen a intervalos regulares y crecen en otros intervalos,

constituyendo lo que se denomina un ciclo celular, es decir, una serie ordenada de acontecimientos que conducen a la replicación celular con una repetición alternante de periodos de crecimiento y división celular.

Este ciclo celular, al menos en eucariontes de divergencia tardía, se divide en cuatro fases secuenciales: una fase G_1 , en donde ocurren todas las funciones vegetativas como el crecimiento o aumento de la masa celular por duplicación de organelos y de macromoléculas y la producción de material celular o de secreción, entre otras; una fase S (síntesis), en donde se duplica el DNA, si la célula se prepara hacia una nueva división; una fase G_2 , en la que se terminan los preparativos para la reproducción, se sintetizan proteínas asociadas a los cromosomas y finalmente disminuye la actividad metabólica, y una fase M (mitosis), en la que ocurre el reparto del material genético, seguida por la citocinesis o división del citoplasma (Figura 7). La progresión a través de estas

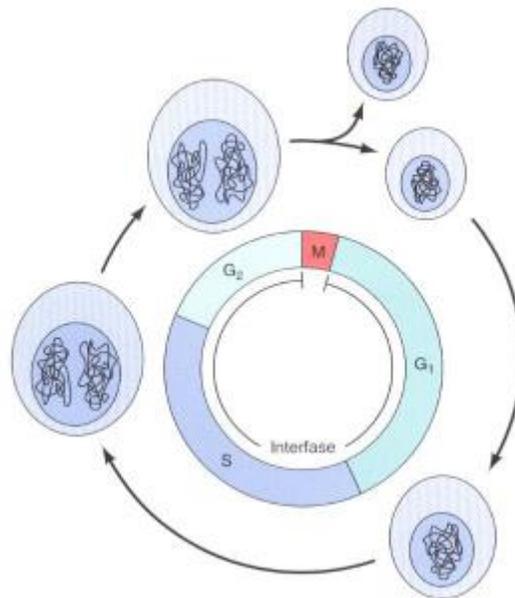


Figura 7. Fases del ciclo celular. El ciclo de división de la mayoría de las células eucariotas se divide en cuatro fases diferenciadas: M, G1, S y G2 (tomado de Cooper y Hausman, 2007).

etapas del ciclo celular está controlada mediante un sistema regulador conservado, que no sólo coordina los diferentes procesos del ciclo celular sino que también acopla el ciclo celular con las señales extracelulares que controlan la proliferación celular (Jiménez-García et al., 2011).

Las fases G_1 , S y G_2 se incluyen en un conjunto llamado interfase. Las fases G_1 y G_2 permiten a la célula evaluar si las condiciones del medio externo e interno son las adecuadas para llevar a cabo la reproducción. No hay células que sigan este ciclo en forma continua ni una duración específica para cada una de estas fases; de hecho, la duración de la fase G_1 puede variar en función de las condiciones internas y de las señales extracelulares, de tal forma que una célula en G_1 , al final de esta fase, entra en un punto que se conoce como de restricción o de inicio, durante el cual la célula evalúa su capacidad de completar el ciclo y “decide” si se duplica su DNA y sigue el proceso o si entra en una fase de reposo o G_0 durante días, semanas, meses o años, antes de volver a reproducirse. Algunas células especializadas permanecen en esta fase en forma indefinida, otras en cambio, estimuladas por agentes mitógenos como hormonas, nutrientes o factores de crecimiento, pueden salir de G_0 , recomenzar el ciclo y dividirse (Jiménez-García et al., 2011).

La fase M es el periodo más llamativo del ciclo celular, en el que se produce la reorganización de casi todos los componentes de la célula. Durante la mitosis (división nuclear) los cromosomas se condensan, la envoltura nuclear de la mayoría de las células se desintegra, el citoesqueleto se reorganiza para formar el huso mitótico, y los cromosomas migran a los polos opuestos. Tras la segregación de los cromosomas se suele producir la división de la célula (citocinesis).

Tradicionalmente la mitosis se divide en cuatro etapas – profase, metafase, anafase y telofase –. El comienzo de la profase queda determinado por la aparición de los cromosomas condensados, cada uno de los cuales está constituido por dos cromátidas hermanas (las moléculas de DNA hijas que se produjeron en la fase S). En la tabla 1 se resumen las características de cada etapa.

La regulación del ciclo celular es un proceso complejo que se efectúa como una cascada de reacciones de fosforilación y desfosforilación debidas a la acción de quinasas y fosfatasas, respectivamente, que determinan el cambio conformacional que puede activar o inhibir su acción.

Las quinasas o cinasas que participan en la regulación del ciclo celular son enzimas que dependen de proteínas reguladoras denominadas ciclinas; cuando las ciclinas no están presentes las quinasas no muestran actividad alguna. Las cinasas dependientes de ciclinas (CDK1) pueden asociarse con diferentes ciclinas y de esta manera se determina el tipo de proteína que se fosforila (Jiménez-García et al., 2011). CDK1 y su proteína de unión ciclina-B, forman un complejo esencial para la entrada a mitosis. La regulación de CDK1 se realiza por varios mecanismos incluyendo la degradación de la ciclina-B, mientras que la ciclina-B es blanco para la degradación por proteasas durante el inicio de la anafase por conjugación con la ubiquitinación que se forma por el complejo promotor de anafase.

3.3 Núcleo

El núcleo fue la primera estructura intracelular descubierta y originalmente descrita por Franz Bauer en 1802 y después popularizada por Robert Brown

PROFASE	<ul style="list-style-type: none"> → El nucléolo se descondensa y se desintegra. → Inicia la construcción del aparato mitótico. → Los centriolos emigran hacia los polos de la célula y los microtúbulos crecen y se modifican. → Los cromosomas se condensan, observándose como largos filamentos. → Se desintegra la envoltura nuclear
METAFASE	<ul style="list-style-type: none"> → Los cromosomas se desplazan hacia el ecuador de la célula para quedar alineados en el plano ecuatorial. → Cada cromosoma se mantiene en tensión sobre la placa metafásica orientado con los ejes longitudinales en ángulo recto con el eje del huso.
ANAFASE	<ul style="list-style-type: none"> → Las cromátidas hermanas se separan para quedar como cromosomas independientes. → Cada cromosoma tiene su propio centrómero y se une a uno de los polos, hacia el que migra, por una fibra del huso. → La célula y el huso se alargan. → Inicia la citocinesis. → Inicia la formación del tabique o surco de división.
TELOFASE	<ul style="list-style-type: none"> → Se inicia la formación de la envoltura nuclear y las membranas en general. → Los cromosomas se descondensan. → Inicia la nucleogénesis (formación del nucléolo). → El huso mitótico desaparece y los microtúbulos se despolimerizan.

Tabla 1. Características de las etapas de la mitosis (tomado de Jiménez-García et al., 2010).

(Harris, 1999; revisado en Dundr y Misteli, 2001). Este organelo confina al genoma constituido por Ácido Desoxirribonucleico (DNA). La parte codificante del genoma, organizada en forma de genes alberga la información necesaria para dar lugar a productos génicos, los RNAs y las proteínas. El genoma nuclear

aparece bajo dos formas estructuralmente diferentes durante el ciclo celular: la cromatina (en interfase), como material filamentoso disperso por la mayor parte del núcleo, y los cromosomas (durante la división), fácilmente observables como entidades morfológicas o corpúsculos independientes. Ambas formas están constituidas por las mismas moléculas lineales muy largas de DNA de doble hebra, estrechamente asociadas a proteínas (Cooper y Hausman, 2007). El núcleo interfásico de los eucariontes de divergencia tardía está bien organizado, compartimentalizado y es un organelo dinámico. El genoma está empaquetado dentro de los confines del núcleo y los cromosomas individuales ocupan regiones distintas y limitadas, llamadas territorios cromosómicos, también posee varios compartimentos nucleares especializados, entre los que se encuentra el complejo de poro nuclear (NPCs), la lámina nuclear (NL), la membrana nuclear interna (INM), los compartimentos de los factores de *splicing* (SFCs) también conocidos como motas o patrón moteado, los cuerpos de Cajal (CB), los cuerpos de la oncoproteína de la leucemia promielocítica (PML), el nucléolo y otros compartimentos más (Dundr y Misteli, 2001) (Figura 8). El núcleo interfásico de los eucariontes de divergencia tardía está bien organizado, compartimentalizado y es un organelo dinámico. La compartimentalización facilita los eventos requeridos para la expresión génica que incluyen la transcripción, el procesamiento y modificaciones del RNA (Prieto y McStay, 2005). Los eucariontes se caracterizan por la presencia de un núcleo bien diferenciado y está presente en los protistas, plantas y metazoarios.

3.3.1 Nucléolo

El nucléolo es un gran dominio nuclear que se forma mediante interacciones proteína-proteína y proteína-ácidos nucleicos en zonas específicas de los cromosomas acrocéntricos en células humanas, llamadas regiones organizadoras del nucléolo (NORs; Sheer, Weisenberger, 1994).

La principal función del nucléolo es transcribir los genes ribosomales para generar un precursor de RNA ribosomal (pre-RNA_r) que será sujeto a varios procesamientos postranscripcionales como son la metilación, la pseudouridilación de nucleótidos específicos, y el corte de los espaciadores internos y externos, para generar los RNAs ribosomales 18S, 5.8S y 28S.

Los genes ribosomales son repetidos, se calcula que el ser humano posee alrededor de 200 copias ordenadas en tándem, mientras que en anfibios,

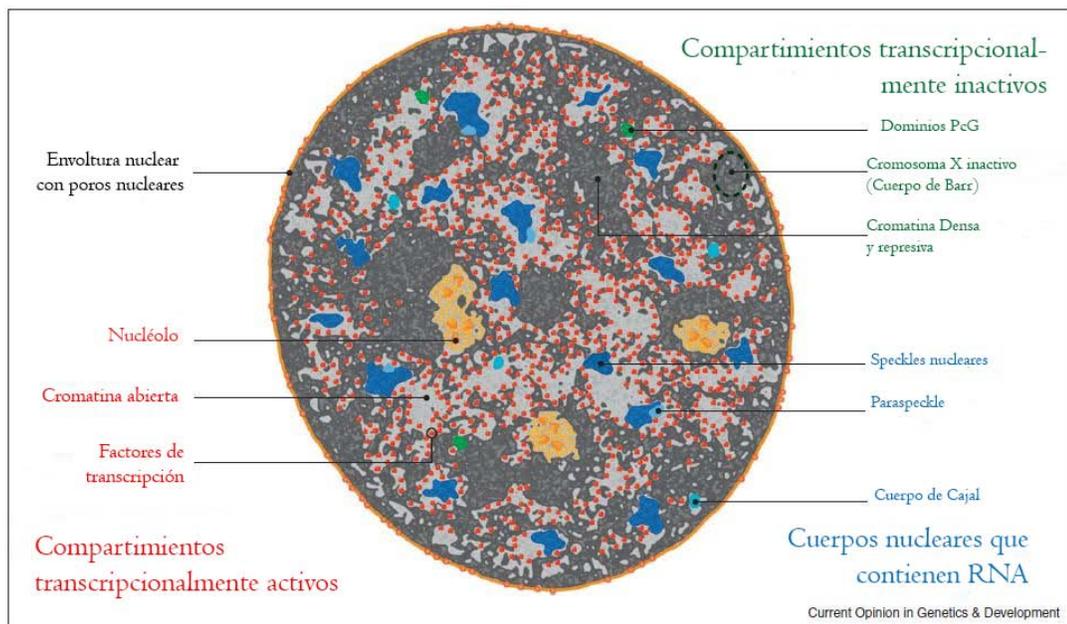


Figura 8. Esquema de la arquitectura nuclear. Uno de los compartimientos más conspicuos del núcleo es el nucléolo (modificado de Caudron-Herger y Rippe, 2012).

helechos y gimnospermas están en el orden de miles (Sáez-Vázquez y Medina, 2008).

Entre otras funciones del nucléolo se encuentra el transporte de moléculas que residen en el núcleo hacia el citoplasma, la modificación de RNAs pequeños nucleolares, el ensamble de ribonucleoproteínas, el reclutamiento de proteínas reguladoras y el control del envejecimiento celular (Olson et al., 2000; Lam et al., 2005; Lo et al., 2006; Raska et al., 2006; Rosete et al., 2007). También actúa como un sensor del estrés y del ciclo celular (Boisvert et al., 2007). Al igual que otros compartimientos nucleares, el nucléolo, también es dinámico y tanto su composición de proteínas, como su arquitectura se modifican en respuesta a condiciones ambientales (Andersen et al., 2005; Boulon et al., 2010), actúa como un sensor de daño al DNA y su reparación, y también durante el metabolismo de telómeros (Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015).

Morfológicamente está constituido por tres regiones o subcompartimientos: centros fibrilares (CFs), componente fibrilar denso (CFD) y componente granular (CG), estas regiones fueron visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (Scheer y Weisenberger, 1994; Figura 9). Cada componente corresponde a las diferentes etapas de la biogénesis de los ribosomas, por ejemplo, los CFs se asocian con los genes ribosomales y con las proteínas involucradas en la transcripción (Cheutin et al., 2002; Koberna et al., 2002), mientras que las proteínas a cargo del procesamiento del pre-RNA^r y la formación de los pre-ribosomas se ubican en el CFD, en este componente se ha localizado a la nucleolina. En el CG se realiza el ensamble y la maduración de pre-ribosomas y constituye la mayor parte del nucléolo (Raska et al., 2006).

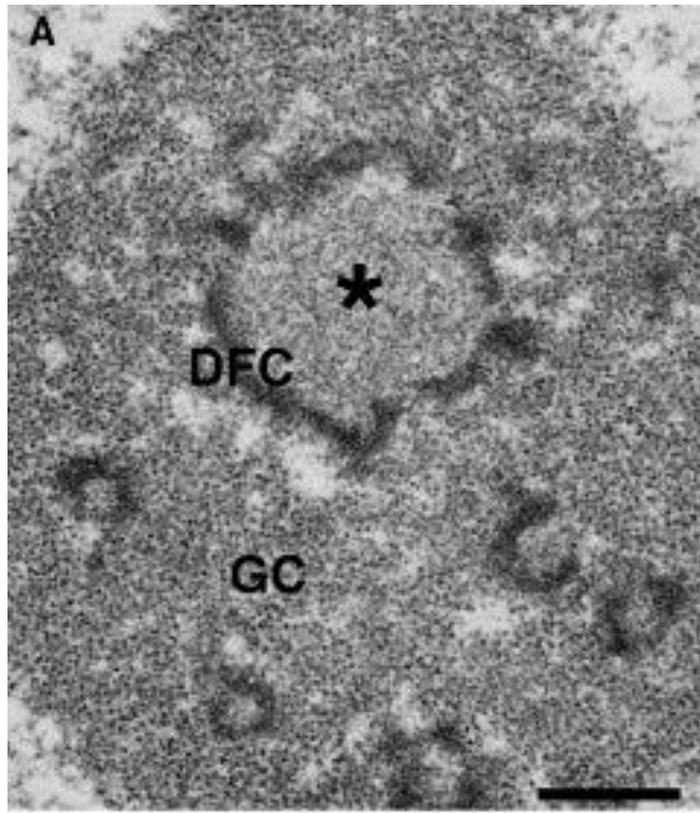


Figura 9. Nucléolo de una célula HeLa observado por microscopía electrónica de transmisión. Los CFs se indican con un asterisco y están rodeados por el CFD y embebidos por el CG. Barra 1 μm (tomado de Sirri et al., 2008)

La primera descripción del nucléolo se atribuye a Wagner (1835) y Valentin (1836). Sin embargo, Fontana lo reportó como un "cuerpo oviforme" existente en células epidérmicas de anguila en 1781 (Fontana y Nyon, 1781; revisado en Farley et al., 2015).

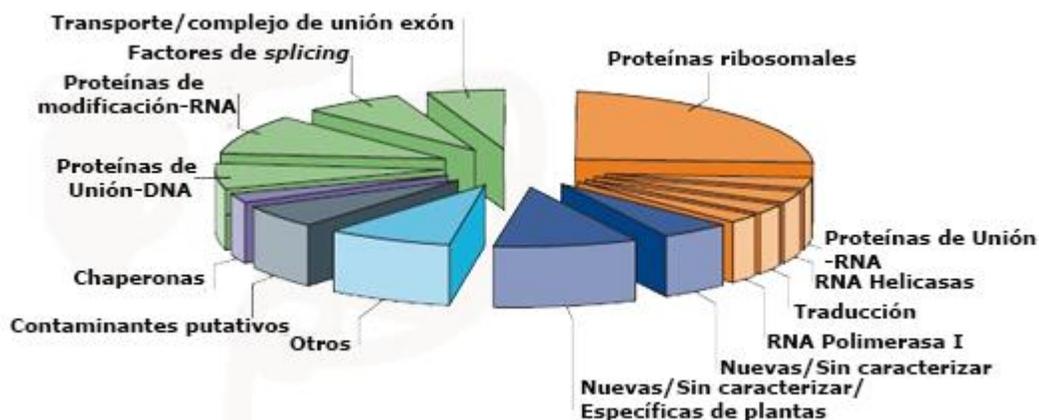


Figura 10. Proteoma nucleolar mediante purificación e identificación por espectrometría de masas. Las proteínas se agruparon de acuerdo a su función molecular (modificado de Boisvert et al., 2007).

Bioquímicamente está constituido por los genes DNAr, RNAr y por proteínas necesarias para la síntesis y procesamiento del RNAr. En nucléolos humanos se han identificado alrededor de 726 proteínas (Andersen et al, 2002, 2005; Figura 10), entre las que destacan RNA polimerasa (Pol I), B23, hPop1, Ki-67, Nop52, nucleolina, p53, etc.; mientras que en *Arabidopsis thaliana* se identificaron alrededor de 217 proteínas nucleolares (Pendle et al., 2005). Además posee algunas proteínas que son retenidas en el nucléolo por la presencia de secuencias específicas de aminoácidos, a estas secuencias se les conoce como señales de localización nucleolar (NoLSs) que presentan cierta carga electrostática (Musinova et al., 2015).

La morfología del nucléolo es diversa, su apariencia varía y su número y tamaño depende del tipo celular, a etapa del ciclo celular en que se encuentra y su actividad transcripcional (Shaw y Jordan, 1995). Durante el ciclo celular, la síntesis de RNAr es discontinua, y los nucléolos casi siempre desaparecen

durante la división somática (Goessens, 1984). Sin embargo, en células animales y en algunas especies de plantas (Giménez-Martin et al., 1977; Sheldon y Lehman, 1981; Risueño y Medina, 1986), el nucléolo permanece durante la mitosis según el tipo de división que presente o por que retienen proteínas para inhibir su actividad como lo han demostrado análisis proteómicos donde regulan el ciclo celular (Visintin y Amon, 2000).

3.3.2 Nucleologénesis

Durante la mitosis el nucléolo se disgrega y se reorganiza en telofase alrededor de las NORs proceso conocido como nucleologénesis (Boisvert et al., 2007).

En general, en la división celular el nucléolo experimenta una serie de cambios morfológicos que consisten en tres procesos:

Desorganización profásica. El nucléolo disminuye de tamaño, su forma se hace irregular (polilobulado o estrellado) y aparecen pequeñas masas de material nucleolar libres entre los cromosomas profásicos, posteriormente se pierde la envoltura nuclear. Bioquímicamente, se incrementa el nivel de cinasa dependiente de ciclina (CDK1-ciclina B), por lo que se activa la fosforilación de la maquinaria transcripcional del DNAr y se detiene la actividad transcripcional, desensamblándose los componentes de la Pol I y el nucléolo.

Transporte metafásico y anafásico. El nucléolo ha perdido su individualidad. La maquinaria de transcripción y la Pol I se asocian al DNAr en las NORs (sitios asociados a las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos) donde se localizan los clusters de genes de DNAr.

Reorganización telofásica. En este punto disminuye el nivel de CDK1-ciclina B, desfosforilando la maquinaria transcripcional del DNAr, lo cual permite que los componentes de la Pol I se ensamblen y se reinicie la actividad transcripcional. Durante la telofase temprana aparecen cuerpos laminares entre los cromosomas en vías de descondensación. A la par se distinguen regiones fibrilares rodeadas por regiones granulares que corresponden a los cuerpos prenucleolares (PNBs). Avanzada la telofase, estos cuerpos se fusionan entre sí en torno a los NORs. Cuando esta actividad termina se observan uno o más nucléolos maduros, los PNBs ya no existen y el número de nucléolos depende de la cantidad de NORs (Paniagua, 2007).

Barbara McClintock a partir de sus trabajos con microsporas de *Zea mays*, señaló que los nucléolos se forman a partir de un cuerpo adyacente a la constricción secundaria del cromosoma 6 al cual nombró "nucleolar organizing region" (NORs). MacClintock estableció que los NORs estaban constituidos por secuencias repetidas y la separación experimental de ellas permite delucidar que están formados por múltiples genes nucleolares. Ella correlacionó los hallazgos de Heitz y Navashin (1931 y 1934, respectivamente), quienes encontraron que el tamaño de la constricción secundaria está relacionada con el volumen nucleolar (revisado en Giménez-Abián et al., 2001; Dimario, 2004).

La nucleogénesis es un proceso muy dinámico en el que ocurren diversos cambios bioquímicos debido a la reactivación de la transcripción. Durante la mitosis abierta (desensamble de la envoltura nuclear) que generalmente se presenta en los eucariontes de divergencia tardía, el nucléolo se desintegra al iniciar la mitosis y la transcripción por la Pol I cesa. La maquinaria transcripcional permanece ensamblada con la Pol I y sus factores de transcripción se unen a las NORs en los cromosomas. Por el contrario, los

componentes de procesamiento del pre-RNA_r se encuentran en al menos dos sitios diferentes: 1) en la región pericromosómica (RP) donde estos componentes rodean a todos los cromosomas al inicio de la profase y permanecen hasta la telofase temprana; 2) en las fosas derivadas del nucléolo (FDN), que son partículas citoplásmicas relativamente grandes de forma esferoide, numerosas y que contienen componentes nucleolares como el U3, ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNAs), fibrilarina, nucleolina, B23 y Nop52 (Dundr et al., 2000). En anafase los FDN miden de 1 a 3 μ m, están presentes en cantidades de 100 por célula y al llegar a la telofase su número ha disminuido de pocas a ninguna. Estas partículas se mueven rápidamente dentro del citoplasma y cuando están en contacto con la envoltura nuclear desaparecen dentro del núcleo; es importante mencionar que sólo se encuentran en algunas líneas celulares de mamíferos donde los niveles de expresión de la maquinaria de procesamiento son altos (Dundr et al., 1997; Dundr y Olson, 1998).

Durante el desensamble y el reensamble nucleolar ocurren varios eventos moleculares:

En profase se incrementan los niveles de la cinasa dependiente de la ciclina (B1-CDK1) por la fosforilación de los componentes de la maquinaria de transcripción del DNA_r. La hiperfosforilación de los componentes del complejo de iniciación de Pol I favorecen el desensamble nucleolar y se inicia con la pérdida de la subunidad RPA39 de la Pol I del CF antes de que se rompa la envoltura nuclear (Figura 11; Boisvert et al., 2007).

Por otra parte, los componentes de procesamiento salen del nucléolo junto con los pre-RNA_r parcialmente procesados que se encontraban asociados al CFD antes de que la transcripción se detuviera y componentes de procesamiento de

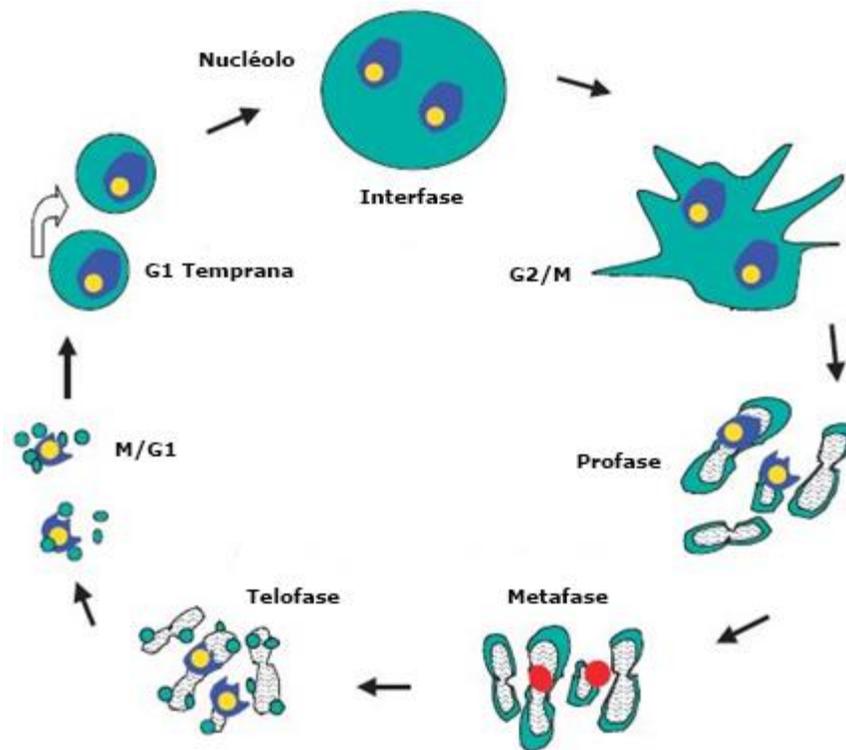


Figura 11. Ciclo del nucléolo en células humanas. El nucléolo durante la interfase está organizado en tres componentes: los centros fibrilares (amarillo) que contienen el DNAr; el componente fibrilar denso (azul) que corresponde a los sitios de transcripción y procesamiento inicial del RNAr; y el componente granular (verde) que corresponde al procesamiento final del RNAr. En la transición de G2/M, la maquinaria de procesamiento (verde) abandona el nucléolo y durante la profase se distribuye parcialmente sobre la superficie de todos los cromosomas condensados. El DNAr presente sobre algunos cromosomas se silencia (amarillo y azul). En la metafase, la transcripción por la Pol I se reprime (puntos rojos indicando DNAr inactivo). La reactivación de la transcripción por la Pol I en telofase es concomitante con el encendido de la maquinaria de procesamiento del RNAr dentro de los PNBs (puntos verdes) en la periferia de los cromosomas. Al final de la mitosis (M/G1), los dominios nucleolares inician su reensamble alrededor de los NORs activos y se van asociando con varios NORs para dar lugar a un nucléolo completo en la etapa G1 (tomado de Hernández-Verdun et al., 2002).

RNAr, tales como la fibrilarina y B23, se disocian simultáneamente del CG y el CFD. Aunque muchos componentes de procesamiento son redistribuidos del nucléolo al citoplasma durante la mitosis, otros se unen en las regiones PRs que se componen de capas homogéneamente distribuidas de la maquinaria de

procesamiento del RNAr, tales como ribonucleoproteínas, U3RNA, pre-RNAr y fibrilarina, pero también contiene proteínas no nucleolares como nucleoplasmina fosforilada (Boisvert et al., 2007).

Durante la metafase la maquinaria transcripcional de Pol I se encuentra asociada a las NORs de los cromosomas y algunas subunidades de la Pol I han dejado el CF o bien, su concentración es tan baja que no es perceptible. Asimismo, la mayoría de los componentes de procesamiento se encuentran asociados en la superficie de los cromosomas en las RPs (Dundr et al., 2000; Boisvert et al., 2007).

En la anafase la mayoría de los componentes de procesamiento del RNAr pueden permanecer en asociación con los cromosomas en RP o son empaquetados dentro del citoplasma en FDNs que contienen proteínas de procesamiento temprano y tardío del RNAr, U3snoRNA y pre-RNAr parcialmente procesados (Boisvert et al., 2007) Ya cuando las células entran a anafase tardía-telofase temprana, los niveles de cinasa B1-CDK1 disminuyen permitiendo la reactivación de la transcripción del rRNA. Asimismo, la envoltura nuclear se vuelve a formar y partículas pequeñas se disocian de las FDNs durante la telofase y se adentran al núcleo. Inicialmente, la mayoría del contenido de los NDF formados es transferido a estructuras fibrogranulares que se agrupan en la superficie de los cromosomas, los PNBs. A la par, la RP se desensambla cuando los cromosomas comienzan a descondensarse y la mayoría de sus componentes son incorporados a los PNBs, mientras que el resto se distribuye en el nucleoplasma. La fusión de los PNBs en las regiones de organización nucleolar da lugar a lo que se conoce como nucleogénesis (Ochs et al., 1985; Boisvert et al., 2007).

El silenciamiento de los genes ribosomales es acompañado por la fosforilación inhibitoria del factor de transcripción SL1 dirigida por CDC-2 ciclina B. El nivel de regulación ocurre al inicio de la transcripción. Tampoco se observan transcritos nacientes de las NORs sin embargo permanecen firmemente unidos a estas regiones los factores de transcripción UBF y SL1, así como la polimerasa I. Por el contrario, otros componentes nucleolares se dispersan a varios subcompartimientos nucleares, como RNAr parcialmente procesado, proteínas y pequeños nucleolares ribonucleoproteicos (snoRNPs), lo que lleva a pensar que no se desintegran completamente ciertas unidades funcionales del nucléolo durante la mitosis, pudiendo así la célula transmitir las a las siguientes generaciones (Scheer y Hock, 1999).

El núcleo se reensambla después de cada mitosis y en consecuencia, la salida mitótica es un periodo crucial para el establecimiento de las funciones nucleares. Cuando los cromosomas buscan los polos mitóticos, la envoltura nuclear se reforma mientras la cromatina se descondensa para formar territorios cromosómicos. La maquinaria nuclear responsable para la expresión génica es importada progresivamente dentro del núcleo o activada y los cuerpos nucleares se reensamblan.

El ensamble nucleolar consiste de dos pasos, el primero es la activación de la maquinaria de transcripción, la cual depende del decremento en la actividad de Cdk1-ciclina B. La maquinaria de transcripción de la Pol I, permanece durante la mitosis asociada a los genes de la NOR (Figura 12). El segundo paso es la agrupación de la maquinaria de procesamiento en el nucléolo, pasando por la formación de cuerpos prenucleolares (PNBs). Los cuales son descritos como cuerpos nucleares poco móviles, participantes en el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento en los sitios de transcripción del DNAr (Savino et

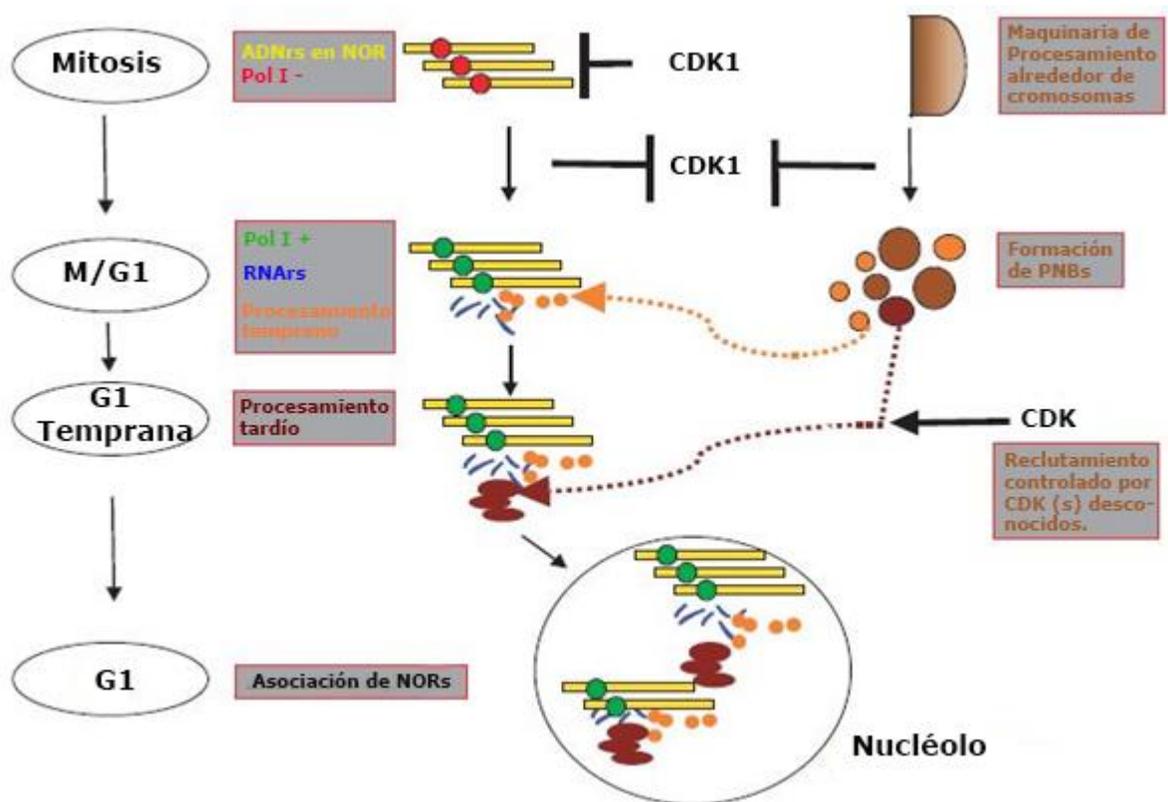


Figura 12. Ensamble nucleolar en células cíclicas. Durante la mitosis la maquinaria de la RNAP I está asociada con el DNAr en las NORs (barras amarillas) y la maquinaria de procesamiento del RNAr (gradiente café) está en el citoplasma sobre todo alrededor de todos los cromosomas. La transcripción por Pol I se mantiene reprimida (puntos rojos) durante la mitosis por la actividad de CDK1-ciclina B. Al final de la mitosis (M/G1), la inhibición de CDK1-ciclina B se activa, liberándose e induciéndose la transcripción de Pol I (puntos verdes) e induce la formación de PNBs correspondiente para diferentes complejos de procesamiento del RNAr (naranja y cuerpos café). El reclutamiento (flecha naranja discontinua) de la maquinaria de procesamiento temprano va a la par con la activación de la transcripción (RNAr en azul), pero la maquinaria de procesamiento tardío (flecha discontinua café) se reclutaron más tarde por una vía controlada (G1 temprana). Finalmente en G1, la asociación de varios NORs ayudan a la formación nucleolar (tomado de Hernández-Verdun et al., 2002).

al., 2001). Según Benavente (1991), el movimiento de los PNBs se debe a la activación de la transcripción, no a su formación en sí (Savino et al., 2001). Por otro lado, Olson y col. (2000) explican que la transferencia de componentes de estos cuerpos al nucléolo en formación es principalmente a través de

mecanismos de difusión. Algunos autores proponen que el ensamble de RNAs nucleares pequeños se da por una vía nuclear específica.

3.3.3 Características de los Cuerpos prenucleolares (PNBs)

Los PNBs son estructuras esféricas densas de material fibrogranular de entre 0.1 y 0.2 μm que contienen RNA y proteínas involucradas en el procesamiento del pre-rRNA como la fibrilarina, la nucleolina (C23), Nop52, BOP1, PM-Scl 100, la proteína B23 y B23/NO38, que se localizan en la periferia de los cromosomas (Ochs et al., 1985, Hernández-Verdun et al., 1993; Jiménez-García et al., 1994; dr et al., 2000). Los PNBs también contienen snoRNAs involucrados en el procesamiento del pre-rRNA como U3, U8 y U14. La proteína B23 se localiza en la periferia (región granular) y la C23 en el centro (región fibrilar) (Spector et al., 1984), lo que implica que los PNBs son nucléolos miniatura.

Inicialmente se consideró que los PNBs eran estructuras móviles que transportaban la maquinaria de procesamiento del rRNA hacia los sitios de transcripción por la RNAP I, sin embargo, el análisis en células vivas utilizando microscopía de lapsos en tiempo real demostró que los PNBs no se mueven desde la superficie de los cromosomas a los nucléolos y mediante microscopía electrónica evidenciaron partículas y fibras densas que conectan los PNBs al nucléolo (Dundr et al., 2000; Savino et al., 2001).

Los PNBs se clasificaron en dos tipos con base en el contenido de sus proteínas y su dinámica: PNBs de maduración temprana y PNBs de maduración tardía. Los PNBs de maduración temprana contienen fibrilarina. Los PNBs de maduración tardía albergan proteínas como BOP1, B23 y Nop52. Los primeros se visualizaron 15 minutos antes de su reclutamiento al nucléolo naciente, mientras que los segundos 80 minutos antes de ser reclutados (Hernández-Verdun 2005).

El ensamble nucleolar es un proceso que se realiza paso a paso, donde primero se forma el CFD con ayuda de los PNBs de maduración temprana y posteriormente el CG con la ayuda de los PNBs de maduración tardía (Dundr et al., 2000; Savino et al., 2001). El análisis cuantitativo del reensamble nucleolar muestra que hay intervalos de aproximadamente 18 minutos entre la formación del CG y el CFD.

4. Hipótesis

Si en el protista *Giardia lamblia* hay material nucleolar organizado intranuclearmente, entonces durante la mitosis podría desensamblarse en la profase y reensamblarse en el transcurso de la telofase como en eucariontes superiores.

5. Relevancia e impacto del proyecto en el área de estudio

Giardia lamblia es un parásito que representa un problema de salud humana y recientemente se publicó la presencia de nucléolo en este organismo (Jiménez-García *et al.*, 2008), sin embargo, se desconoce cuál es su morfología durante el ciclo celular y principalmente, si se presenta el proceso de nucleogénesis como en mamíferos y plantas, siendo esta una aportación al conocimiento de la biología del protista y de la evolución en los eucariontes en general.

6. Metodología

6.1 Cultivos

Se cultivaron trofozoitos de *G. lamblia* de la cepa WB en condiciones axénicas en medio de cultivo TYI-S-33 (Keister, 1983) suplementado con 0.7 g/L de bilis bovina y ovina (SIGMA Cat. N° B8381), 10% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL Cat. N° SH-30072.03) y una mezcla de antibióticos: Ampicilina 0.2 g/L y Ceftazidima 0.2 g/L (Ampicillin salt sodium SIGMA Cat. N°A9518) (Ceftazidima "Izadima" TM). Inicialmente los cultivos se realizaron en tubos de borosilicato de 13x100 con tapón de rosca (Pyrex™) conteniendo 7ml de medio de cultivo a 37°C durante 72 horas para obtener una semiconfluencia.

Transcurridas las 72 horas, los tubos de cultivo se sumergieron en un baño de hielo durante 20 minutos para relajar los parásitos, separar la monocapa y centrifugarlos por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C (Hettich centrifuge Mod. Universal 32R). Los botones celulares se lavaron dos veces con PBS (Amortiguador salino de fosfatos) estéril frío para realizar el conteo de la población en un hemocitómetro (Propper Lumicyte™ Cat N° LCB) con un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo Axiostar) y continuar su procesamiento.

También se tomó un inóculo de estos botones celulares de 5×10^5 trofozoitos, los cuales crecieron por 48 horas más en vasos coplin de tapa de rosca (Pyrex™) conteniendo 21 ml de medio y cubreobjetos (Corning N°1 de 22x22mm) previamente sometidos a ácido acético glacial al 96% (CTR Scientific) y alcohol etílico al 70% (Hycel N°1822) y autoclaveados, con la finalidad de dar porosidad al vidrio y permitir la adherencia de los parásitos.

A la par de los cultivos de *G. lamblia* también se obtuvieron células HeLa crecidas en cubreobjetos (Corning N°1 de 22x22mm), las cuales fueron donadas por el Instituto Nacional de Cancerología, con la finalidad de tener un testigo positivo de las metodologías.

6.2 Tinción de Plata para NORs y PNBs

Microscopía de Luz. Los cubreobjetos con la monocapa de células (*G. lamblia* y HeLa) se lavaron tres veces con PBS. La tinción de plata se realizó siguiendo la metodología de Goodpasture y Bloom (1975). Se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (EMS Cat N°16360) durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se decantó esta solución y se realizó una segunda fijación con solución de Carnoy "A" (ácido acético glacial:etanol al 75% en dilución 1:3) durante 5 minutos. Las monocapas se rehidrataron con etanol al 70%, 50% y agua destilada por 10 minutos en cada solución.

A los cubreobjetos se les retiró el exceso de agua, a un portaobjetos se le adicionó varias gotas de AgNO_3 al 50% y encima de colocó el cubreobjetos con la monocapa en contacto con la solución. El portaobjetos se acomodó sobre una plancha calentada previamente a 60°C dejándose durante 10 minutos. Se lavó el cubreobjetos 10 veces con agua bidestilada helada, se retiró el exceso de agua y la reacción se reveló adicionando dos gotas de $\text{NH}_4\text{-Ag}$ y dos gotas de solución reveladora (formaldehído al 3%, acetato de sodio y ácido fórmico al 88%) durante 45 segundos para la monocapa de *G. lamblia* y durante 30 segundos en el caso de las células HeLa. La reacción se detuvo con varios lavados con agua bidestilada helada (Jiménez-García et al., 1998).

Posteriormente, algunos de los cubreobjetos con la muestra se deshidrataron con alcoholes graduales y xilol para ser montados con resina sintética. El registro de imágenes se realizó utilizando un microscopio óptico Zeiss modelo Axiostar equipado con un objetivo 100x acromático con apertura numérica 1.25, acoplado a una cámara Canon y programa EOS-1000D.

Microscopía Electrónica de Transmisión. Los cubreobjetos con la muestra restantes a los cuales se les realizó la técnica de plata y los botones celulares, se deshidrataron en etanol en concentraciones de 30, 50, 70, 90 y 96% durante 10 minutos en cada uno y 100% tres veces durante 10 minutos cada uno. Se pasaron por el disolvente intermediario óxido de propileno tres veces durante 10 minutos cada uno y posteriormente se sometieron a preinclusión en una mezcla de óxido de propileno y resina Epon 812 (Electron Microscopy Science) en dilución 1:1 durante 24 horas. Los frascos y tubos que contenían los cubreobjetos en preinclusión se destaparon para que se evaporara el óxido de propileno, se incluyeron en resina Epon fresca y se polimerizaron durante 48 horas a 60°C.

Una vez polimerizada la monocapa de células sobre los cubreobjetos se colocaron sobre hielo seco, la diferencia de temperatura permitió separar el cubreobjetos de la resina epóxica quedándose en ella la monocapa. Las giardias en monocapa y en botones celulares se sometieron a ultramicrotomía, obteniéndose cortes ultrafinos de 60nm de espesor, los cuales se montaron en rejillas de cobre, se observaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-1010 de la marca Jeol y el registro de imágenes se realizó utilizando una cámara MTI modelo CCD-300-RC.

6.3 Técnica convencional para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Los botones de parásitos se fijaron con una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.3 a temperatura ambiente durante 2 horas para ser lavados tres veces con PBS durante 10 minutos cada uno. Algunos botones de parásitos se posfijaron con tetraóxido de osmio al 1% en PBS durante 1 hora y posteriormente se deshidrataron, se sometieron al agente intermediario óxido de propileno, se preincluyeron y polimerizaron como ya se explicó anteriormente.

Una vez obtenidos los bloques polimerizados con los parásitos, se sometieron a ultramicrotomía para obtener cortes ultrafinos de 40-60 nm y se montaron en rejillas de cobre. Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo acuoso al 4% durante 20 minutos y citrato de plomo al 0.3% durante 10 min. Se observaron en el microscopio electrónico de transmisión y se registraron imágenes de giardias en las diferentes etapas de la división celular.

6.4 Técnica para Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

De los botones de parásitos procesados mediante la técnica convencional para microscopía electrónica se obtuvieron cortes semifinos de 150 nm de grosor, los cuales se montaron en cubreobjetos libres de polvo y grasa utilizando calor, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en un Microscopio de Fuerza Atómica de la marca Digital Instruments modelo Bioscope con un controlador NanoScope III A en modo Tapping utilizando una punta DNP de 20-60 nm de radio de curvatura, el cual está montado sobre un microscopio fotónico invertido de la marca Zeiss.

6.5 Tinción específica *in situ* del ADN en bloque “NaMaUr”

Botones de parásitos se fijaron con glutaraldehído al 3% en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.025M pH 6.9 durante 6 horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se lavaron con esta misma solución tres veces durante 10 minutos cada uno y se postfijó con una mezcla de paraformaldehído al 4% e hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5N durante 48 horas. Posteriormente los botones se lavaron con agua destilada tres veces durante 10 minutos cada vez y se sometieron a tratamiento de ácido acético al 1% tres ocasiones durante 10 minutos cada uno.

Después, se realizó la deshidratación con metanol a concentraciones crecientes (30, 50, 70, 90 y 100%), 10 minutos en cada alcohol y se incubaron con una mezcla de metanol y anhídrido acético en dilución 5:1 durante 48 horas (tinción en bloque). Transcurrido el tiempo, los botones se sometieron a una inmersión en metanol absoluto durante 10 minutos y a la tinción en bloque con acetato de uranilo al 8% en metanol absoluto durante 2 horas a 60°C. Después de la tinción en bloque, se lavaron los botones de parásitos con metanol absoluto dos veces durante 10 minutos cada vez y se sometieron a inmersión en óxido de propileno dos veces durante 10 minutos cada una (Testillano et al., 1991).

La preinclusión y la inclusión de los botones se realizaron según el procedimiento de la técnica convencional. El material incluido se sometió a ultramicrotomía, obteniendo cortes ultrafinos de 40-60 nm de grosor, se montaron en rejillas de cobre cubiertas con formvar y se observaron al microscopio electrónico de transmisión con el respectivo registro de imágenes.

7. Resultados

7.1 Los Nucléolos de *Giardia lamblia* durante la interfase

Giardia durante la interfase posee dos núcleos diploides (Benchimol, 2005), ambos con sus respectivos nucléolos ubicados en los polos (Jiménez-García et al., 2008; Figura 13).

Dentro de los nucléolos se reconocen el componente fibrilar denso (CFD), componente fibrilar (CG) y los centro fibrilares (CDF) (Figura 14).

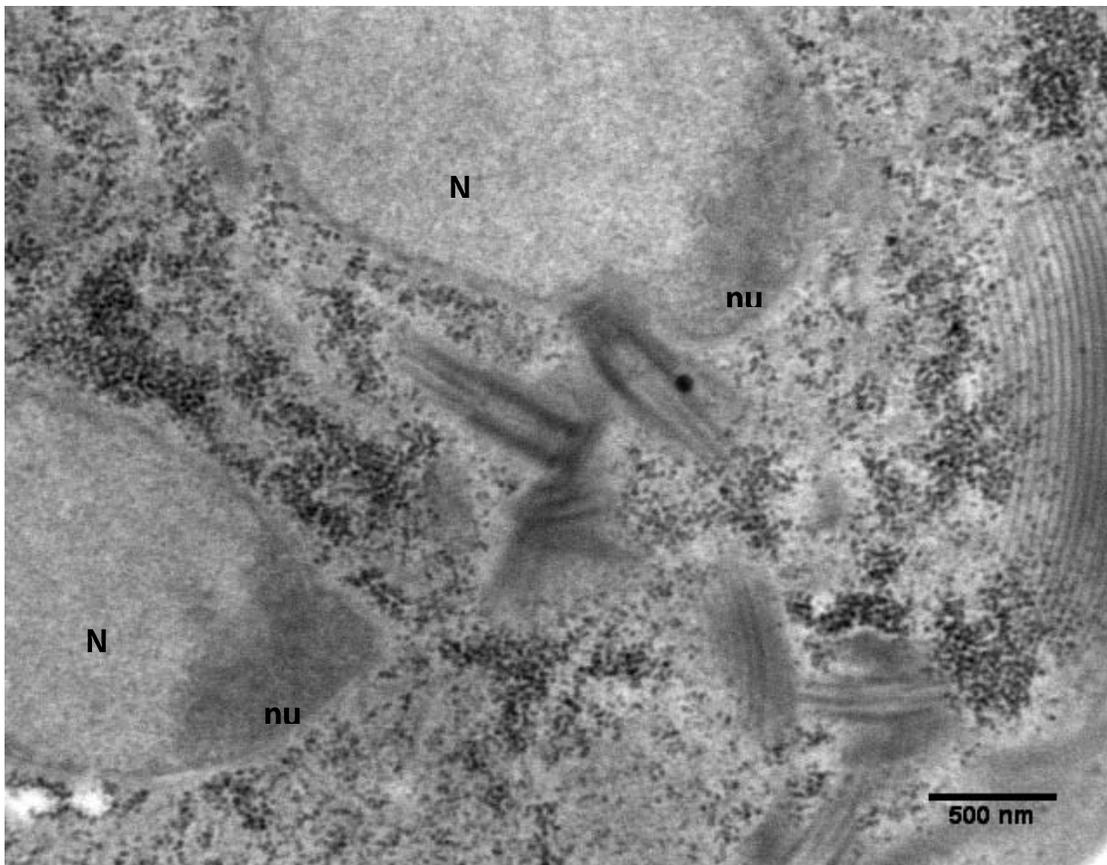


Figura 13. Micrografía electrónica de los núcleos diploides. Cada núcleo tiene forma de pera y sus respectivos nucléolos se ubican en los polos. N, núcleos; nu, nucléolos.

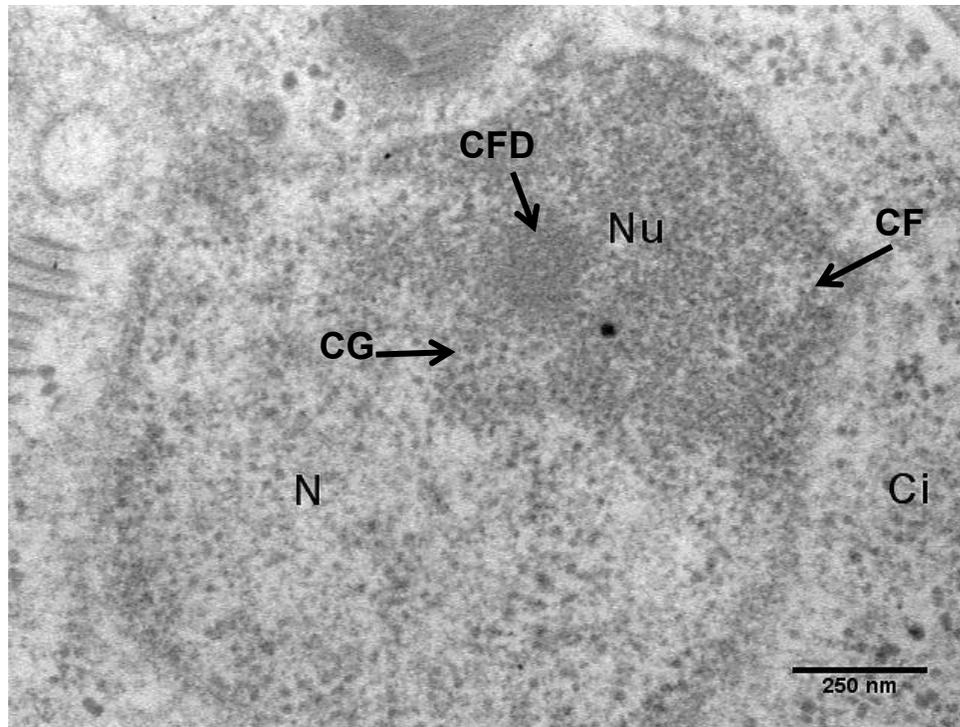


Figura 14. Nucléolo interfásico de *G. lamblia* observado mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando contraste uranilo-plomo. Componente fibrilar denso (CFD), componente granular (CG), centros fibrilares (CF), núcleo (N), citoplasma (Ci), nucléolo (Nu).

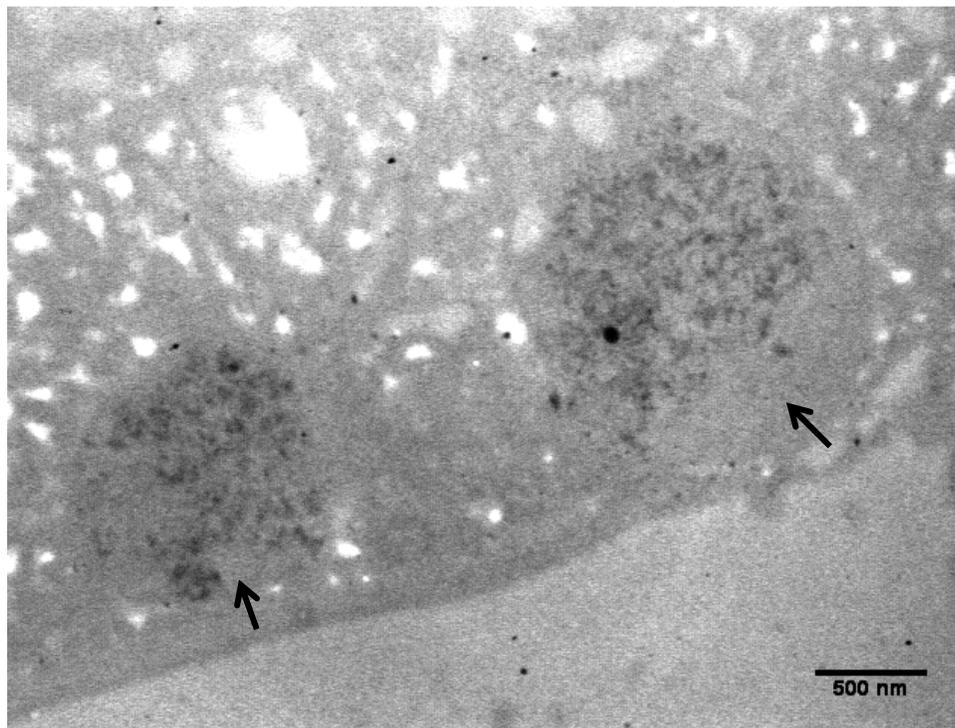


Figura 15. DNA de núcleos interfásicos de *G. lamblia*, contrastados con la técnica de NaMaUr. Las flechas muestran las zonas que corresponden a los nucléolos.

Los núcleos poseen manchones de heterocromatina y la eucromatina se encuentra dispersa en el nucleoplasma, Esto fue visualizado con ayuda de la técnica NaMaUr que es una técnica específica para DNA (Figura 15).

Los nucléolos teñidos con plata corroboran su posición polarizada (Figura 16).

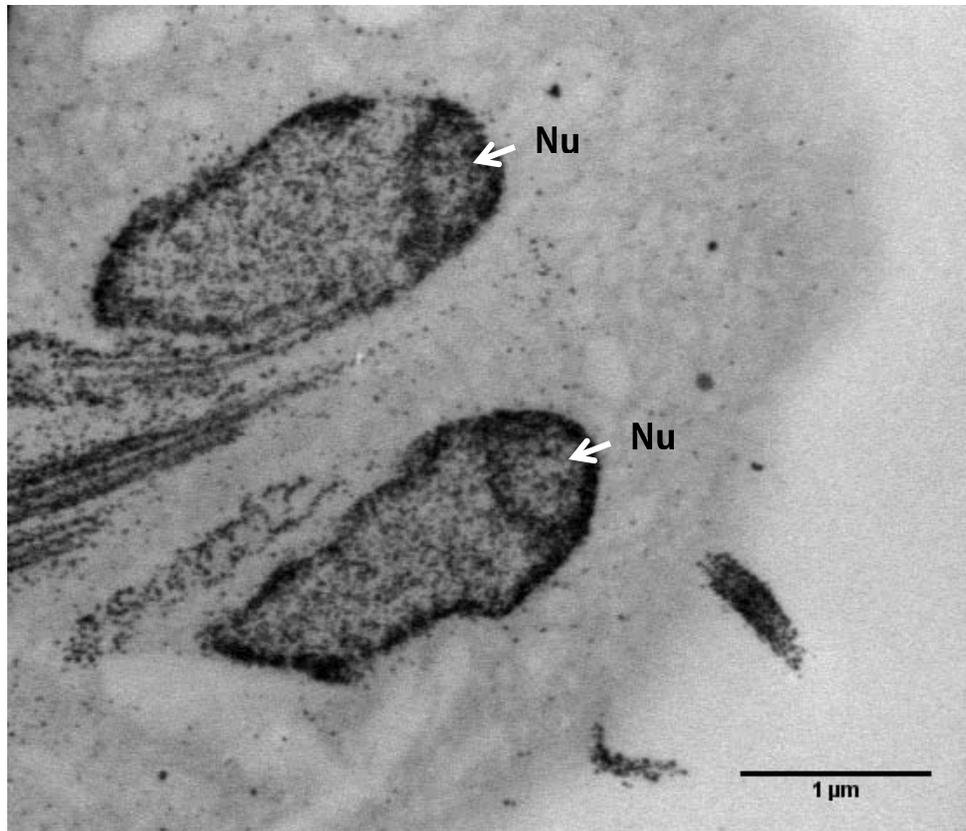


Figura 16. Micrografía electrónica de transmisión de los núcleos de *G. lamblia* teñidos con plata amoniacal. Se observan gran cantidad de precipitados de plata, principalmente en el área que corresponde a los nucléolos y en la periferia de los núcleos. Nu, nucléolo.

7.2 Nucléolos durante el ciclo celular con tinción de plata

La técnica de Goodpasture y Bloom (1975) ha sido muy utilizada para la impregnación de proteínas nucleolares en diferentes tipos celulares. En el caso

de *G. lamblia*, esta técnica permitió visualizar las AgNORs en las diferentes etapas de la división celular, tanto para microscopía óptica como electrónica.

En eucariontes de divergencia tardía, el nucléolo se desensambla durante la profase en PNBs, sin embargo en *G. lamblia* no es así. La tinción de plata para NORs en MF mostró material altamente contrastado en el área periférica dentro de los núcleos en interfase, esta impregnación corresponde a los nucléolos (Figura 16). Sus dos núcleos diploides sufren mitosis de una manera similar a otras células eucariotas, conserva etapas del ciclo celular típicas como son: profase, metafase, anafase y telofase (Figuras 17 b, c, d y e, respectivamente), pero el material nucleolar permanece compacto y adosado a la envoltura nuclear.

Como fue descrito en Sagolla y colaboradores (2006), cada núcleo se somete a una mitosis semiabierta donde los microtúbulos bipolares rodean el exterior del núcleo (con una envoltura nuclear intacta), y entran al núcleo a través de poros especiales para ponerse en contacto con los cinetocoros durante la profase (Sagolla et al., 2006) y proseguir con las demás etapas del ciclo celular. Por microscopía de luz, el material nucleolar se observa a lo largo de la división como un componente periférico, fibrogranular y siempre impregnado de plata (Figuras 16 b, c, d y e) con una escasa tinción en el nucleoplasma.

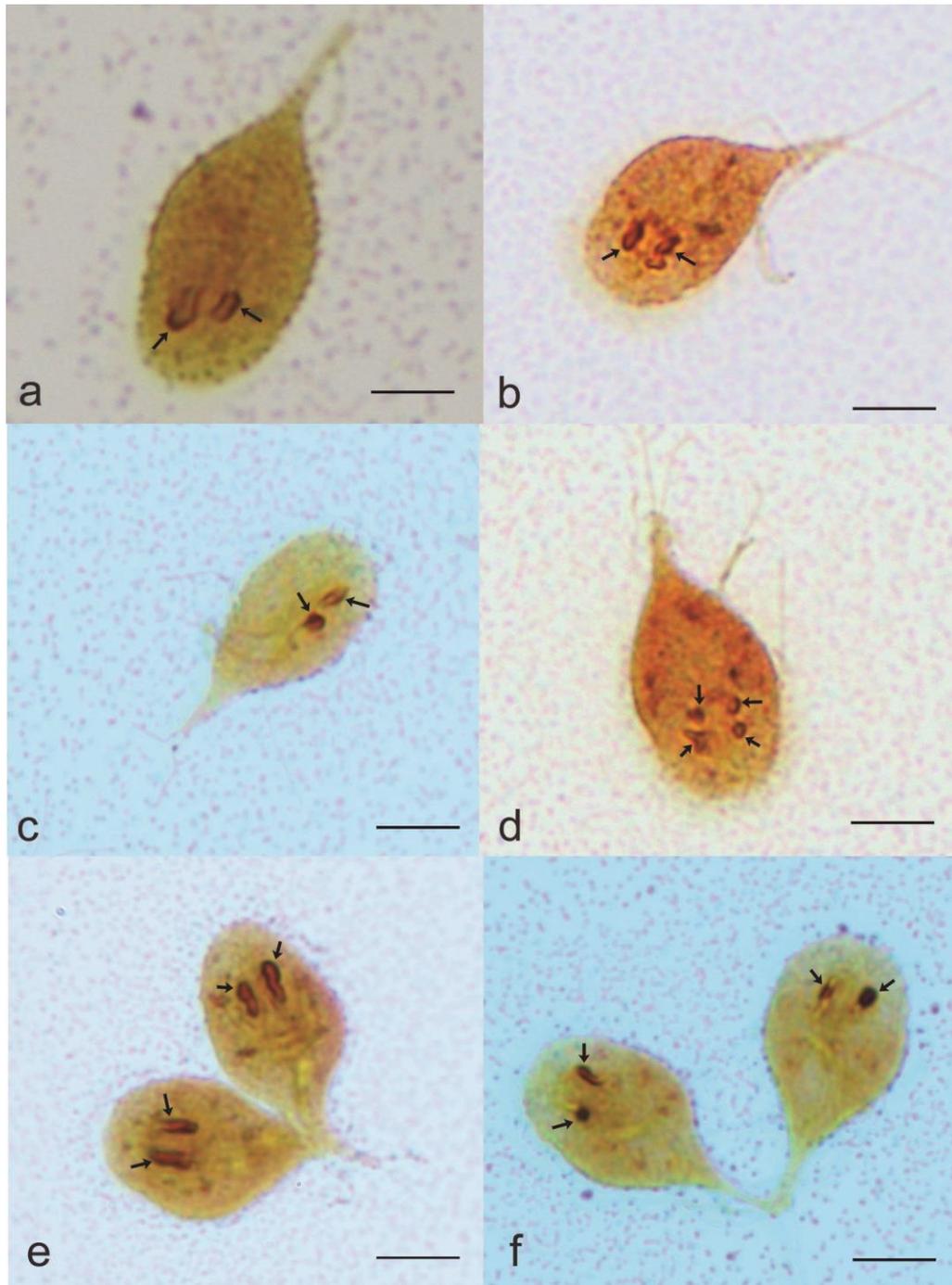


Figura 17. Micrografías ópticas de ciclo celular de *G. lamblia* teñido con plata amoniacal. a) Interfase, b) Profase, c) Metafase, d) Anafase, e) Telofase y f) Estadio G1. Las flechas indican en a) los nucléolos, y de b a f) los NORs. Barra: 5µm.

7.3 Nucleologénesis en *Giardia lamblia* a partir de PNBs?

Igualmente por microscopía fotónica y tinción de plata para AgNORs durante la telofase, no se observa material disperso o de tipo discreto adicional al correspondiente a los nucléolos como lo ya observado en las diferentes etapas del ciclo celular (Figura 18). Este material es más evidente a nivel de microscopía electrónica, pero no se muestran límites claros (Figura 19). Los resultados indican que en este eucarionte de divergencia temprana no existe el proceso de nucleologénesis, ya que como lo mostraron los resultados del ciclo celular, los componentes que forman el nucléolo se mantienen adosados en la periferia de los núcleos sin formar PNBs.

Para corroborar la ausencia de PNBs durante la telofase de *G. lamblia*, se realizaron observaciones utilizando el microscopio de fuerza atómica (Figura 20), con el escaneo detallado del nucléolo no se detectaron PNBs.

7.4 Tinción de plata en células HeLa

Con la finalidad de tener un testigo positivo de la tinción de plata y verificar que lo observado no se tratara de artefactos, se observaron células HeLa. En la figura 21 se muestran células en interfase, profase, metafase, anafase y telofase, en los cuales se pueden observar organizadores nucleolares y PNBs (Figura 21).

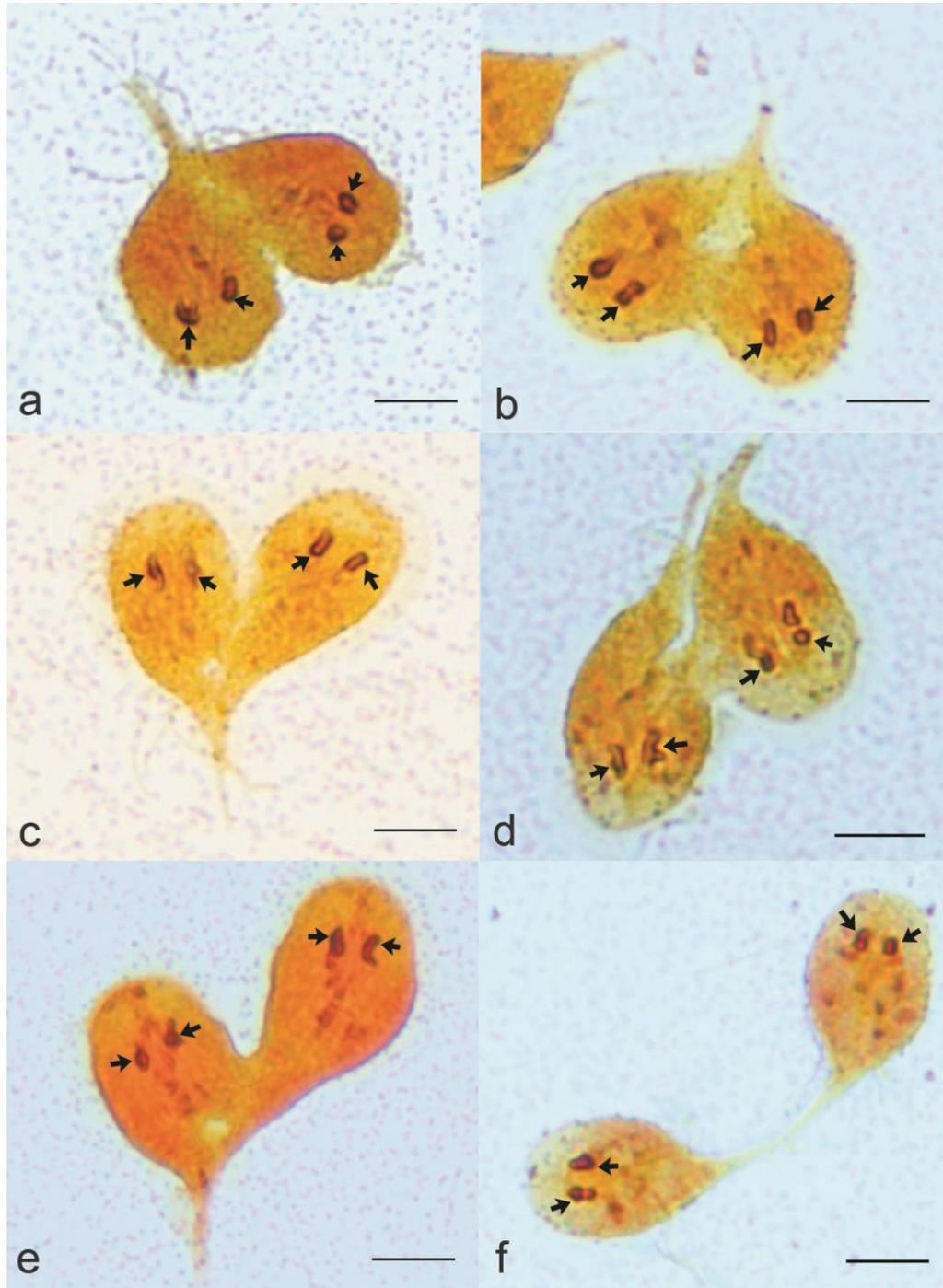


Figura 18. Micrografías ópticas del transcurso de la telofase en *G. lamblia* teñidas con plata amoniaca. Las flechas indican los NORs. Barra: 5µm.

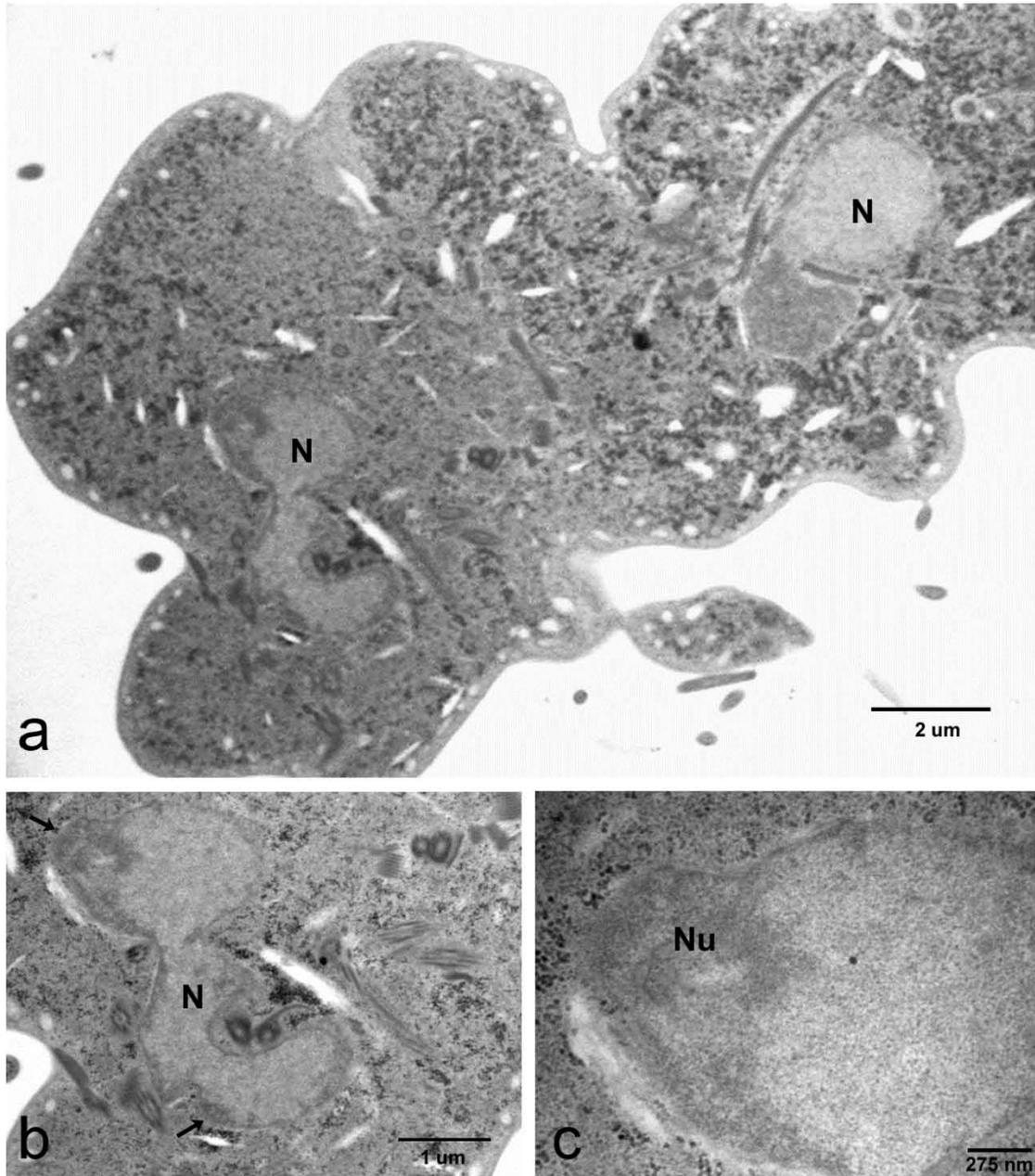


Figura 19. Micrografía electrónica con tinción convencional de una anafase tardía. a) Se observa la iniciación de la citocinesis y la separación de núcleos. b) Durante la separación de los núcleos el material nucleolar se distingue como material más electrodenso y en posición periférica a la envoltura nuclear. c) En lo que parece ser el núcleo madre, el nucléolo se ubica en un polo nuclear. Núcleo (N), nucléolo (Nu).

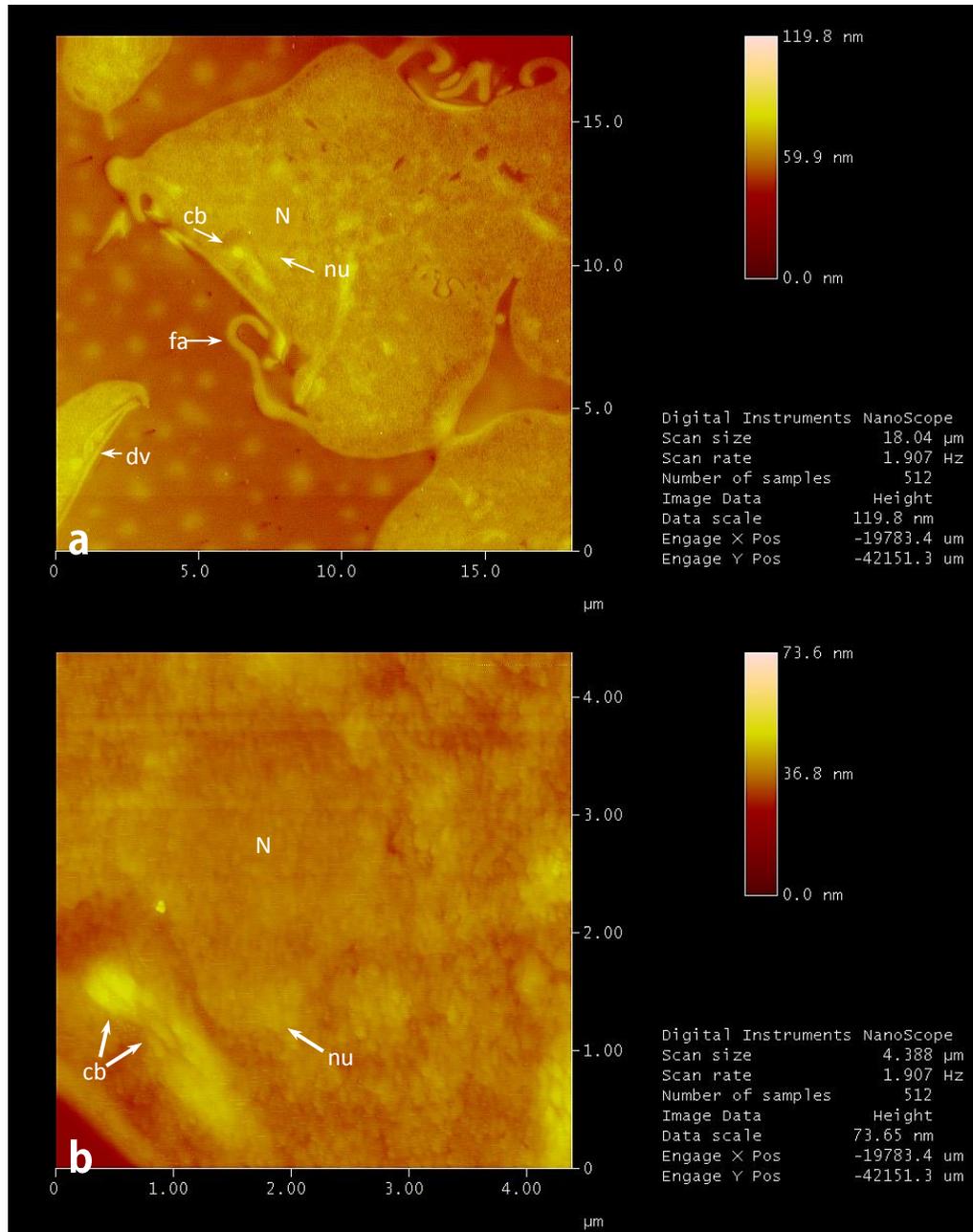


Figura 20. Micrografía de fuerza atómica de una telofase. a) Vista en bajo aumento donde se alcanza a distinguir el inicio de la citocinesis. b) Detalle de una núcleo donde se aprecia el nucléolo como material fibrogranular. Cb, cuerpo basal; N, núcleo; nu, nucléolo; dv, disco ventral.

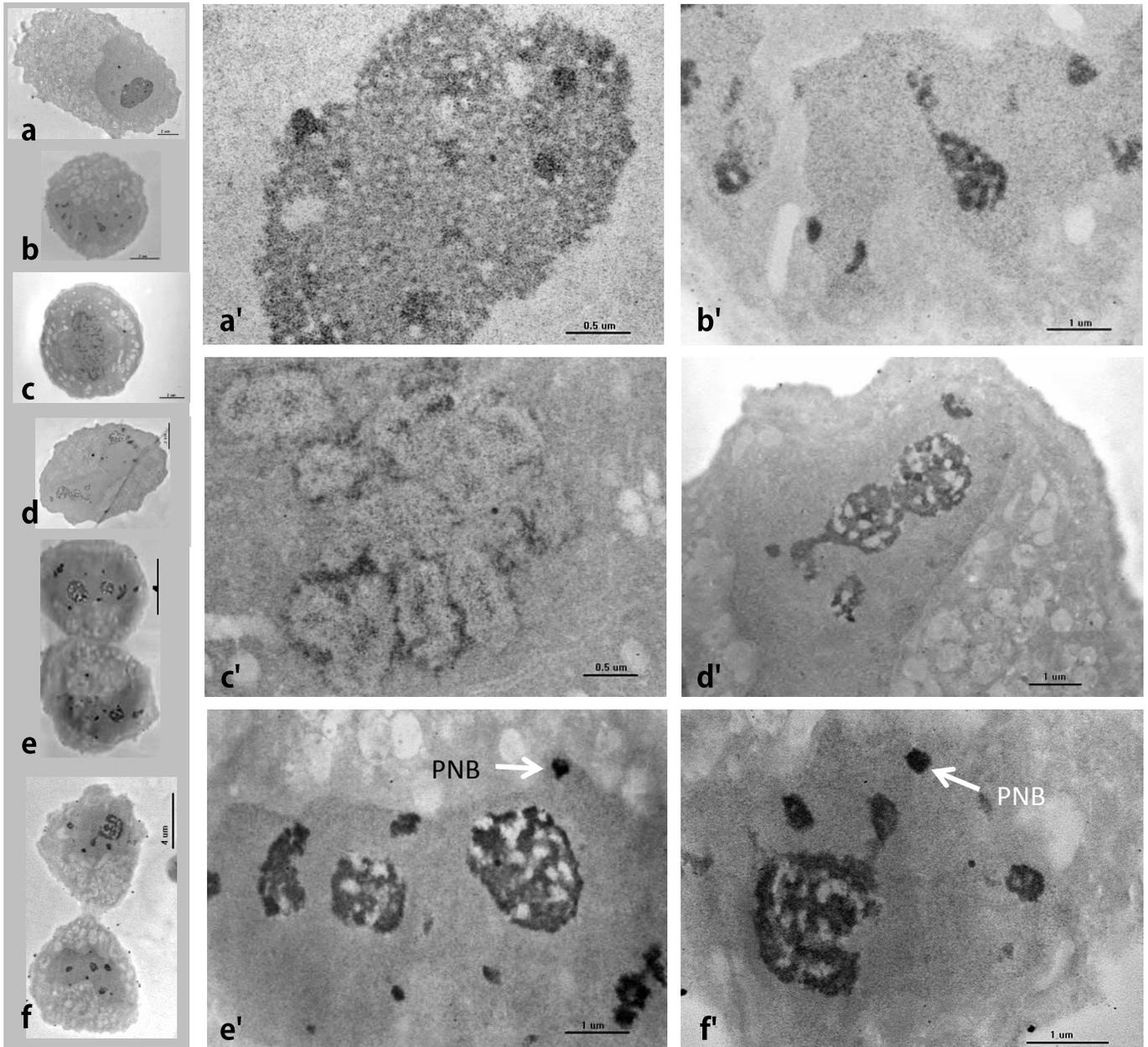


Figura 21. Micrografías electrónicas de células HeLa en diferentes estadios de la división celular con tinción de plata. a-a') Interfase, b-b') profase, c-c') metafase, d-d') anafase, e-e' y f-f') telofase. En c' se pueden identificar los NORs teñidos en algunos cromosomas metafásicos. En e' y f' se muestran algunos PNBs aislados (cabezas de flechas), que se están fusionando con otros componentes nucleolares para formar el nuevo nucléolo. Es interesante observar que en las células telofásicas uno de los núcleos, el que se cree corresponde a la célula hija su proceso de reformación está menos avanzado.

8. *D i s c u s i ó n*

Giardia lamblia es considerado un excelente sistema para el estudio de la evolución de procesos celulares fundamentales por que representa el brazo más temprano del linaje de los eucariontes (Cavalier-Smith, 1993). Los trofozoitos de este eucarionte carecen de Golgi, peroxisomes, mitocondrias y algunos autores citaban la ausencia de nucléolo (Guo et al., 2005). Jiménez-García et al., (2008) demostraron la presencia del nucléolo utilizando tinción de plata para estructuras NOR (AgNOR), estudios que fueron corroborados posteriormente (Tian et al., 2010).

Los NORs están constituidos por genes repetidos en tándem para la síntesis del rRNA. La expresión de los genes ribosomales está estrechamente vinculada con las regiones fibrilares del nucléolo. Se considera que en estas regiones se inicia la transcripción dependiente de la Pol I. Asociadas a las NORs existen algunas proteínas (nucleolina y B23) a las que se le denomina proteínas AgNOR debido a que se les puede evidenciar en el nucléolo en interfase por medio de técnicas argénticas. Las AgNORs se pueden identificar como puntos negros en el nucléolo. Su tamaño y número refleja la actividad nucleolar y la proliferación celular. Durante la mitosis en las NORs se ubican los genes responsables de la re-organización del nucléolo durante la telofase y son unas de las regiones del genoma más conservadas en la evolución de los organismos eucariontes (Cooper, 2008). De ahí la importancia de su análisis tanto a nivel molecular como morfológico, ya que sus posibles variantes suelen ser selectivamente neutras.

G. lamblia presenta una mitosis semejante a otras células eucariotas, conservando etapas reconocibles como profase, metafase, anafase y telofase,

pero presenta una mitosis semiabierta donde la envoltura nuclear permanece intacta (Sagolla et al., 2006). La división celular de *Giardia* requiere la duplicación y reorganización de ambos núcleos y complejas estructuras del citoesqueleto, que deben ser separados con precisión y redistribuidas entre las dos células hijas (Nohynkova et al., 2006; Sagolla et al., 2006; Tůmová et al., 2007; Davids et al., 2008).

El comportamiento del nucléolo de *G. lamblia* durante las diferentes etapas de la mitosis no ha sido estudiado. Los resultados del presente trabajo muestran que el nucléolo se mantiene durante toda la mitosis, es decir, no se disgrega como ocurre en otros eucariontes de divergencia tardía, ni forma PNBs para la reorganización durante la telofase. Es un hecho que la unidad de repetidos básica de *G. lamblia* es de 5.4 kb, así como los SSRNA, LSRNA y el RNA 5.8S son los más pequeños reportados para algún eucarionte (Boothroyd et al., 1987), quizá el tamaño de los RNAr tan pequeños influya para que no se requiera una maquinaria compleja de ensamble y desensamble nucleolar.

En el caso de los eucariontes de divergencia tardía, el nucléolo es un gran dominio nuclear donde se transcriben los genes ribosomales, se realiza la maduración y procesamientos de los RNAs 45S para dar lugar a los RNAs ribosomales 18S, 5.8S y 28S. Cuando la célula entra en mitosis abierta en su mayoría y la transcripción se detiene (Boisvert et al., 2007), la envoltura nuclear se desensambla, los RNAs y componentes nucleolares se agrupan y se distribuyen en diferentes lugares, el aparato transcripcional se mantiene ensamblado con Pol I y sus factores de transcripción se asocian y localizan en los NORs de los cromosomas acrocéntricos. El número de copias de los genes de RNAr varía de forma significativa entre especies y las copias múltiples del gen se disponen en tándem, por lo que un nucléolo puede contener genes de

RNAr derivados de más de un NOR. Cuando la célula entra en anafase tardía-telofase temprana, se reactiva la transcripción del RNAr, la envoltura nuclear se reforma e inicia la nucleogénesis; los componentes nucleolares son transferidos a los PNBs como estructuras fibrogranulares que se forman en la superficie de los cromosomas y otros se distribuyen en el nucleoplasma. Como transcurre la telofase, los PNBs se van fusionando hasta formar el nucléolo de la célula hija (Boisvert et al. 2007).

Por su parte en *G. lamblia*, el material nucleolar evidenciado con tinción de plata se mantiene en la periferia de los núcleos con la envoltura nuclear íntegra y persiste en esta posición desde la profase hasta la telofase. Este material al ser observado al microscopio electrónico de transmisión tiene un aspecto fibrilar y granular, cuando los núcleos inician su separación el material nucleolar se mantiene en la periferia y adosado a la envoltura nuclear. La persistencia del nucléolo es una observación constante en varios organismos que presentan mitosis cerrada (Heath, 1980).

Existen otros organismos con mitosis cerrada como las algas unicelulares *Astasia longa* y *Euglena gracilis*, quienes mantienen la envoltura nuclear y el nucléolo a través de los diferentes estados mitóticos, éste se mantiene en posición central y se somete a una constricción sincronizada con el núcleo (Leedale, 1968, Chaly et al., 1977). Otros ejemplos de mitosis cerrada son *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, donde el nucléolo y las NORs permanecen asociadas y posteriormente se dividen con todo el DNA genómico (Granot y Snyder, 1991; Fuchs y Loidl, 2004).

Los resultados de este trabajo sugieren que la formación de nucléolos en células hijas en *Giardia* no requieren la interrupción nucleolar durante la formación de la

división celular ni la formación de PNBs. Desde la primera descripción de los PNBs (Stevens, 1965) en células animales y vegetales, se ha estudiado un patrón para la nucleogénesis incluyendo tanto los fenómenos de interrupción y formación de PNBs.

Es tentador especular sobre el primer concepto de organizador nucleolar propuesto por McClintock (1934). De hecho, el nucléolo se forma desde una región específica de los cromosomas llamada organizador nucleolar, que incluye genes de DNAr. Esta suposición puede no ser cambiada, incluso con los presentes resultados de persistencia nucleolar, la actividad de DNAr puede dar lugar a una estructura nucleolar muy activa a lo largo del ciclo celular.

Proponemos un modelo de nucleogénesis en *Giardia*. El cual incluye una estructura nucleolar persistente básica que incorpora material nucleolar de las células madre mediante un mecanismo independiente de la formación de PNBs sustituidos por un mecanismo de difusión o un mecanismo de transporte.

Si otros parásitos unicelulares presentan el mismo patrón estudiado, como por ejemplo *Trypanosoma cruzi* y *Entamoeba histolytica* también muestran nucléolo periférico o central (López-Velázquez et al., 2005; Nepomuceno et al., 2010; Vázquez-Echeverría et al., 2009) y la división celular es cerrada en *Entamoeba*.

Pensamos que cuando se observa un nucléolo, el material nucleolar puede contribuir a mantener sin interrupción la estructura principal. Sin embargo, a pesar de que no hay cuerpos prenucleolares detectables, no es posible descartar que el material nucleolar se está incorporando a un nucléolo formando. Es sorprendente teniendo en cuenta que la nucleogénesis se puede definir incluso en la ausencia de PNBs. Los PNBs son alrededor de 0,5 μ m de diámetro, y se sugiere: 1) PNBs auténticos no están contribuyendo a la

formación o el mantenimiento de la estructura del nucléolo o 2) que se pueden extender los PNBs a un rango de tamaño incluyendo cuerpos mucho más reducido. Alternativamente, el material nucleolar de las células madre pueden estar definidos por una ruta diferente de la que caracteriza la formación de los PNBs. La presencia de material disperso teñido con plata en telofase como se detecta por microscopía electrónica, puede apoyar la idea de incorporación de material nucleolar a nucléolos no por PNBs. Estudios dinámicos son necesarios para aclarar este aspecto.

En conclusión, hemos demostrado que el nucléolo en trofozoitos de *Giardia lamblia* persiste a través de la división celular en el núcleo y no hay cuerpos prenucleolar detectables durante la telofase.

9. Conclusiones

El material nucleolar del eucarionte de divergencia temprana *Giardia lamblia* no se desensambla durante la profase, es decir, se mantiene durante toda la división celular condensado en la periferia de los núcleos en forma de material granular y fibrilar, sin la evidencia de la formación de PNBs. Por lo tanto, el proceso de nucleogenesis no es similar al observado en la mayoría de los eucariontes de divergencia tardía.

10. Referencias Bibliográficas

- ABEL ES, DAVIDS BJ, ROBLES LD, LOFLIN CE, GILLIN FD, CHAKRABARTI R. 2001. Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. J Biol Chem. 2001. 276(13):10320-10329.
- ADAM RD, NASH TE, WELLEMS TE. 1988. The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. Nucleic Acids Res. 16:4555-4567.
- ADAM RD. 1991. The Biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev, 55:706-732.
- ADAM RD. 2000. The *Giardia lamblia* genome. Int. J. Parasitol. 30:475-484.
- ADAM RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14:447-475.
- ANDERSEN JS, LYON CE, FOX AH, LEUNG AK, LAM YW, STEEN H, MANN M, LAMOND AI. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. Curr Biol. 2002 Jan 8;12(1):1-11.
- ANDERSEN JS, LAM YW, LEUNG AK, ONG SE, LYON CE, LAMOND AI, MANN M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. Nature. 433(7021) :77-83.
- ANDERSSON JO, SJÖGREN AM, HORNER DS, MURPHY CA, DYAL PL, SVÄRD SG, LOGSDON JM JR, RAGAN MA, HIRT RP, ROGER AJ. 2007. A genomic survey of the fish parasite *Spiroplasma salmonicida* indicates genomic plasticity among diplomonads and significant lateral gene transfer in eukaryote genome evolution. BMC Genomics 8, 51.
- ANKARKLEV J, JELSTRÖM-HULTQVIST J, RINGQVIST E, TROELL K, SVÄRD SG. 2010. Behind The Smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species.
- AURRECOECHEA C, BRESTELLI J, BRUNK BP, CARLTON JM, DOMMER J, FISCHER S, GAJRIA B, GAO X, GINGLE A, GRANT G, HARB OS, HEIGES M, INNAMORATO F, IODICE J, KISSINGER JC, KRAEMER E, LI W, MILLER JA, MORRISON HG, NAYAK V, PENNINGTON C, PINNEY DF, ROOS DS, ROSS C, STOECKERT CJ JR, SULLIVAN S, TREATMAN C, WANG H. 2009. GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. Nucleic Acids Res. 37(Database issue):D526-30
- BALDAUF SL. 2003. The Deep Roots of Eukaryotes. Science, 300:1703-1706.

- BARTELT LA1, SARTOR RB. 2015. Advances in understanding Giardia: determinants and mechanisms of chronic sequelae. F1000Prime Rep. 2015 May 26;7:62. doi: 10.12703/P7-62.
- BÁRTOVÁ E, HORÁKOVÁ AH, UHLÍROVÁ R, RASKA I, GALIOVÁ G, ORLOVA D, KOZUBEK S. 2010. Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. J Histochem Cytochem 58(5):391-403.
- BENAVENTE R. 1991. Postmitotic nuclear reorganization events analyzed in living cells. Chromosoma. 100(4):215-220.
- BENCHIMOL M, PIVA B, CAMPANATI L, DE SOUZA W. 2004. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy—new insights. J Struct Biol. 147(2):102-115.
- BENCHIMOL M. 2004a. *Giardia lamblia*: behavior of the nuclear envelope. Parasitol Res 94: 254–264.
- BENCHIMOL M. 2004b. Mitosis in *Giardia lamblia*: multiple modes of cytokinesis. Protist, 155(1):33-44.
- BENCHIMOL M. 2005. The nuclei of *Giardia lamblia*—new ultrastructural observations. Arch Microbiol. 183(3):160-8.
- BOISVERT FM, VAN KONINGSBRUGGEN S, NAVASCUÉS J, LAMOND AI. 2007. The multifunctional nucleolus. Nat Rev Mol Cell Biol. 8(7):574-85.
- BOULON S, WESTMAN BJ, HUTTEN S, BOISVERT FM, LAMOND AI. 2010. The nucleolus under stress. Mol Cell. 40(2):216-27.
- BOOTHROYD JC, WANG A, CAMPBELL DA, WANG CC. 1987. An unusually compact ribosomal DNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res. 15:4065–4084.
- CARRANZA PG, LUJAN HD. 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. Microbes Infect, 12(1):71-80
- CAUDRON-HERGER M, RIPPE K. 2012. Nuclear architecture by RNA. Current Opinion in Genetics & Development, 22:179-187.
- CAVALIER-SMITH T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. Microbiol Rev, 57(4):953-94.

- CHEUTIN T, O'DONOHUE MF, BEORCHIA A, VANDELAER M, KAPLAN H, DEFÉVER B, PLOTON D, THIRY M. 2002. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J Cell Sci*, 115(Pt 16):3297-307.
- CHALY N, LORD A, LAFONTAINE JG. 1977. A light- and electron-microscope study of nuclear structure throughout the cell cycle in the euglenoid *Astasia longa* (Jahn). *J Cell Sci*, 27:23-45.
- COOPER GM, HAUSMAN RE. 2007. La célula de Cooper's. 2a. edición en español. Edit. Marban Libros S.L. Boston University
- CORDERO DEL CM, ROJO VFA, MARTÍNEZ FAR, SÁNCHEZ AC, HERNÁNDEZ RS, NAVARRETE LC, DIEZ BP, QUIROZ RH, CARVALHO VM. 1999. *Parasitología Veterinaria*, Mc Graw Hill, Interamericana, pp 620-623.
- CRAIG EA, GAMBILL BD, NELSON R J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 402-414.
- CROSSLEY R, HOLBERTON DV. 1993. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci*; 59:81-103.
- DAVIDS BJ, WILLIAMS S, LAUWAET T, PALANCA T, GILLIN FD. 2008. *Giardia lamblia* aurora kinase: a regulator of mitosis in a binucleate parasite. *Int J Parasitol*, 38(3-4):353-69.
- DAWSON SC, PAREDEZ AR. 2013. Alternative cytoskeletal landscapes: cytoskeletal novelty and evolution in basal excavate protists. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25:134-141.
- DE LA TORRE C, GIMENEZ-MARTIN G. 1982. The nucleolar cycle. In: *The nucleolus*, Cambridge University Press
- DIMARIO PJ. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol*, 239:99-178
- DUNDR M, MEIER UT, LEWIS N, REKOSH D, HAMMARSKJÖLD ML, OLSON MO. 1997. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma*. 1997 Jun;105(7-8):407-17.
- DUNDR M, OLSON MO. 1998. Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell*, 9(9):2407-22.

- DUNDR M, MISTELI T, OLSON MO. 2000. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol*, 150(3):433-46.
- DUNDR M, MISTELI T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*, 356(Pt 2):297-310.
- ELMENDORF HG, DAWSON SC, MCCAFFERY JM. 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*. 33(1):3-28. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00228-X.
- FARLEY KI, SUROVTSEVA Y, MERKEL J, BASERGA SJ. 2015. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma*. 2015 Feb 12. [Epub ahead of print]
- FAUBERT G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*, 13(1)35-54.
- FUCHS J, LOIDL J. 2004. Behaviour of nucleolus organizing region (NORs) and nucleoli during mitotic and meiotic divisions in budding yeast. *Chromosome Res*. 12, 427-438.
- GIBSON C, SCHANEN B, CHAKRABARTI D, CHAKRABARTI R. 2006. Functional characterisation of the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase A homologue of *Giardia lamblia*. Differential expression of the regulatory and catalytic subunits during encystation. *Int J Parasitol*, 36(7):791-9.
- GIMÉNEZ-ABIÁN JF1, CLARKE DJ, GIMÉNEZ-ABIÁN MI, DE LA TORRE C, GIMÉNEZ-MARTÍN G. 2001. Synchronous nuclear-envelope breakdown and anaphase onset in plant multinucleate cells. *Protoplasma*. 2001;218(3-4):192-202.
- GIMENEZ-MARTIN G, DE LA TORRE C, LOPEZ-SAEZ JF, ESPONA P. 1977. Plant nucleolus: structure and physiology. *Cytobiologie*, 421-462.
- GHOSH S, GHOSH R, DAS P, CHATTOPADHYAY D. 2001. Expression and purification of recombinant *Giardia* fibrillarin and its interaction with small nuclear RNAs. *Protein Expr Purif*, 21(1):40-8.
- GOESSENS G. 1984. Nucleolar structure. *Int Rev Cytol*. 1984;87:107-58
- GOODPASTURE C, BLOOM SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53(1):37-50.

- GROMADKA R, RYTKA J. 2000. Ribosome biogenesis and nucleolar function in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cellular & Molecular Biology letters, 5:191-216.
- GRANOT D, SNYDER M. 1991. Segregation of the nucleolus during mitosis in budding and fission yeast. Cell Motil. Cytoskelet. 20, 47-54.
- GUO J, CHEN Y, ZHOU K, LI J. 2005. Distribution of rDNA in the nucleus of *Giardia lamblia*: detection by Ag-I silver stain. Biotech Histochem, 80(1):31-4.
- HARRIS, H. 1999. The Birth of the Cell, Yale University Press, New Haven
- HEATH B. 1980. Variant mitosis in lower eukaryotes, indicators of the evolution of mitosis? Int Rev Cytol 64: 1-80.
- HEITZ E. 1931. Nukleolen und chromosomen in der Gattung Vicia. Planta 15: 495-505.
- HERNANDEZ-VERDUN D, ROUSSEL P, GAUTIER T. 1993. Nucleolar proteins during mitosis Chromosomes Today pp 79-90
- HERNANDEZ-VERDUN D, ROUSSEL P, GÉBRANE-YOUNČS J. 2002. Emerging concepts of nucleolar assembly. J Cell Sci, 115(Pt 11):2265-70
- HERNANDEZ-VERDUN D. 2005. Nucleolus in the spotlingt. Cell cycle, 4(1)106-108.
- HERNANDEZ-VERDUN D. 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. Histochem Cell Biol, 125:127-137.
- HOLBERTON DV. 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. J Cell Sci, 13(1):11-41
- JIMÉNEZ-GARCÍA LF, SEGURA-VALDEZ ML, OCHS RL, ROTHBLUM LI, HANNAN R, SPECTOR DL. 1994. Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. Mol Biol Cell, 5(9):955-66.
- JIMÉNEZ-GARCÍA LF, ROTHBLUM LI, BUSCH H, OCHS RL. 1989. Nucleogenesis: use of non-isotopic *in situ* hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. Biol Cell, 65(3):239-46.

- JIMÉNEZ-GARCÍA L. 1998. Cytochemical Staining and Enzyme Detection for Electron Microscopy. 127-1-127-21. In: Spector D.L., Goldman R.D., Leinwand L.A. (eds). Cells a Laboratory Manual. Volume 3: Subcellular Location of genes and their products. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- JIMÉNEZ-GARCÍA LF, SEGURA-VALDEZ ML, OCHS RL, ROTHBLUM LI, HANNAN R, SPECTOR DL. 2000. Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. Mol Biol Cell. 1994 Sep;5(9):955-66.
- JIMÉNEZ-GARCÍA LF, ZAVALA G, CHÁVEZ-MUNGUÍA B, RAMOS-GODÍNEZ MP, LÓPEZ-VELÁZQUEZ G, SEGURA-VALDEZ ML, MONTAÑEZ C, HEHL AB, ARGÜELLO-GARCÍA R, ORTEGA-PIERRES G. 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. Int J Parasitol, 38(11):1297-304.
- JIMÉNEZ-GARCIA L.F. (coordinador). 2011. Enciclopedia de Conocimientos Fundamentales. Biología UNAM-Siglo XXI. Pág. 22-48.
- KABNICK KS, PEATTIE DA. 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. Cell Sci, 95 (Pt 3):353-60.
- KEISTER DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77(4):487-8.
- KOBERNA K, MALÍNSKÝ J, PLISS A, MASATA M, VECEROVA J, FIALOVÁ M, BEDNÁR J, RASKA I. 2002. Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. J Cell Biol, 57(5):743-8.
- KRESSLER D, HURT E, BASSLER J. 2010. Driving ribosome assembly. Biochim Biophys Acta, 1803(6):673-83
- KUCIK CJ, MARTIN GL, SORTOR BV. 2004. Common intestinal parasites. Am Fam Physician, 69(5):1161-8.
- LAM YW, TRINKLE-MULCAHY L, LAMOND AI. 2005. The nucleolus. J Cell Sci, 118(Pt 7):1335-7.
- LAM YW, TRINKLE-MULCAHY L. 2015. New insights into nucleolar structure and function. F1000Prime Rep, 7:48. doi: 10.12703/P7-48.
- LANE S, LOYD D. 2002. Current trnds in research into the waterborne parasite *Giardia*. Crit Rev Microbiol 28:123-147.

- LAUWAET T, DAVIDS BJ, REINER DS, GILLIN FD. 2007. *Encystation of Giardia lamblia*. a model for other parasites. *Curr Opin Microbiol*, 10(6):554-9.
- LEEDALE GF. 1968. The nucleus in *Euglena*. In *The Biology of Euglena*, vol. 1 (ed. D. E. Buetow), pp. 185-242. New York and London: Academic Press.
- LEIPE DD, GUNDERSON JH, NERAD TA, SOGIN ML. 1993. Small subunit ribosomal RNA+ of *Hexamita inflata* and the quest for the first branch in the eukaryotic tree. *Mol Biochem Parasitol*, 59(1):41-8
- LEUNG AK, GERLICH D, MILLER G, LYON C, LAM YW, LLERES D, DAIGLE N, ZOMERDIJK J, ELLENBERG J, LAMOND AI. 2004. Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol*, 166(6):787-800.
- LEVINE ND, CORLISS JO, COX FE, DEROUX G, GRAIN J, HONIGBERG BM, LEEDALE GF, LOEBLICH AR 3RD, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J, WALLACE FG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*, 27(1):37-58.
- LO SJ, LEE CC, LAI HJ. 2006. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings. *Cell Res*, 16(6):530-8
- LÓPEZ-VELÁZQUEZ G, HERNÁNDEZ R, LÓPEZ-VILLASEÑOR I, REYES-VIVAS H, SEGURA-VALDEZ ML, JIMÉNEZ-GARCÍA LF. 2005. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 11: 293-299.
- MCARTHUR AG, MORRISON HG, NIXON JEJ, PASSAMANECK NQE, KIM U, HINKLE G, CROCKER MK, HOLDER ME, FARR R, REICH CI, OLSEN GE, ALEY SB, ADAM RD, GILLIN FD, SOGIN ML. 2000. The *Giardia* genome project database. *FEMS Microbiol Lett*, 189:271-273.
- McCLINTOCK B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 21(2): 294-328.
- MORRISON HG, McARTHUR AG, GILLIN FD, ALEY SB, ADAM RD, OLSEN GJ. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317;1921-1926.
- MUSINOVA YR, KANANYKHINA EY, POTASHNIKOVA DM, LISITSYNA OM, SHEVAL EV. 2015. A charge-dependent mechanism is responsible for the dynamic

accumulation of proteins inside nucleoli. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853:101-110.

NAVASHIN M. 1934. Chromosomal alterations caused by hybridization and their bearing upon certain general genetic problems. *Cytologia* 5: 169-203.

NEPOMUCENO-MEJÍA T, LARA-MARTÍNEZ R, CEVALLOS AM, LÓPEZ-VILLASEÑOR I, JIMÉNEZ-GARCÍA, LF, HERNÁNDEZ R. 2010. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol Lett* 313: 41-46.

NIXON JE, WANG A, MORRISON HG, MCARTHUR AG, SOGIN ML, LOFTUS BJ, SAMUELSON J. (2002). A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(6):3701-5

NOHYNKOVÁ E, TUMOVÁ P, KULDA J. 2006. Cell division of *Giardia intestinalis*: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryot Cell*, 5(4):753-61.

OCHS RL, LISCHWE MA, SHEN E, CARROLL RE, BUSCH H. 1985. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, 92(5):330-6.

OLSON MO, DUNDR M, SZEBENI A. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol*. 2000 May;10(5):189-96.

OLSON MO, DUNDR M. 2005. The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol*, 123(3):203-16

PANIGUA R, NISTAL M, SESMA P, ÁLVAREZ-URÍA M, FRAILE B, ANADÓN R, SÁEZ FJ. 2007. *Biología Celular*. 3er ed. McGraw-Hill Interamericana. España. Pp.109-115.

PAREDEZ AR, ASSAF ZJ, SEPT D, TIMOFEJEVA L, DAWSON SC, WANG CJ, CANDE WZ. 2011. An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 108:6151-6156.

PAREDEZ AR, NAYERI A, XU JW, KRTKOVÁ J, CANDE WZ. 2014. Identification of obscure yet conserved actin-associated proteins in *Giardia lamblia*. *Eukaryotic Cell*, 13(6):776-784.

- PENDLE AF, CLARK GP, BOON R, LEWANDOWSKA D, LAM YW, ANDERSEN J, MANN M, LAMOND AI, BROWN JW, SHAW PJ. 2005. Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol Biol Cell*, 16(1):260-9.
- PIVA B, BENCHIMOL M. 2004. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell*. 96(9):735-46.
- POLLARD TD. 2003. The cytoskeleton, cellular motility, and the reductionist agenda. *Nature* 422:741-745.
- PORTUGAL-RAMÍREZ A, MOLL-PALOU M, SALORD-MONTSERRAT C, ESCRIBANO-CARLOS A, MARQUÉS-BOSCH R, 2005. Giardiasis. *Ped Rur Ext*; 35(327):49-54.
- PRIETO JL, MCSTAY B. 2005. Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6):1441-3
- RASKA I, SHAW PJ, CMARKO D. 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol*, 18(3):325-34.
- REGOES A, ZOURMPANOU D, LEÓN-AVILA G, VAN DER GIEZEN M, TOVAR J, HEHL AB. 2005. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J Biol Chem*, 280(34):30557-63.
- RIVERA M, DE LA PARTE MA, HURTADO P, MAGALDI L, COLLAZO M. 2002. Giardiasis intestinal. *Revisión. Invest. Clin.*, 43(2):119-128.
- RISUEÑO MC, MEDINA FJ. 1986. The nucleolar structure in plant cells. *Revis Biol Celular*. 1986;7:1-154
- ROSETE M, PADROS MR, VINDROLA O. 2007. El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. *Medicina (Buenos Aires)*, 67:183-194.
- SAGOLLA MS, DAWSON SC, MANCUSO JJ, CANDE WZ. 2006. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci*, 119(Pt 23):4889-900.
- SAVINO TM1, GÉBRANE-YOUNČS J, DE MEY J, SIBARITA JB, HERNANDEZ-VERDUN D. 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells, 153(5):1097-110.
- SÁEZ - VÁSQUEZ J, MEDINA FJ. 2008. The plant nucleolus. *Advances in botanical research*, 47:1-46.

- SCHEER U, WEISENBERGER D. 1994. The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol*, 6(3):354-9
- SCHEER U, HOCK R. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3):385-90.
- SHAW PJ, JORDAN EG. 1995. SENBERGER D. 1994. The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 6:354-359. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:93-121
- SHELDON S, LEHMAN JM. 1981. Continued presence of nucleoli in human germ cell tumors during mitosis. *Cancer Res*. 1981 Sep;41(9 Pt 1):3666-8.
- SHEN HE, CAO L, LI J, TIAN XF, YANG ZH, WANG Y, TIAN YN, LU SQ. 2011. Visualization of chromosomes in the binucleate intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Parasitol Res*, 109(5):1439-45.
- SIRRI V, URCUQUIHINCHIMA S, ROUSSEL P, HERNANDEZ-VERDUN D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol*, 129(1):13-31.
- SMETANA K, JIRASKOVA ILONA, PERLAKY L, BUSH H. 1999. The silver reaction of nucleolar proteins in main structural compartments of ring-shaped nucleoli in smear preparations. *Acta histochem*, 101:167-183.
- SOGIN ML, GUNDERSON JH, ELWOOD HJ, ALONSO RA, PEATTIE DA. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, 243(4887):75-7.
- SOLTYS BJ, FALAH M, GUPTA RS. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *J Cell Sci*, 109(7):1909-17. □
- SPECTOR DL, OCHS RL, BUSCH H. 1984. Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma*. 1984;90(2):139-48.
- STADELMAN B, MERINO MC, PERSON L, SVÄRD SG. 2012. Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*, 7(9):E45325.
- STEVENS BJ. 1965. The fine structure of the nucleolus during mitosis in the Grasshopper neuroblast cell. *J Cell Biol*, 24:349-68.
- TESTILLANO PS, SANCHEZ-PINA MA, OLMEDILLA A, OLLACARIZQUETA MA, TANDLER CJ, RISUEÑO MC. 1991. A specific ultrastructural method to reveal DNA: the NAMA-Ur. *J Histochem Cytochem*, 39:1427-1438.

- TIAN XF, YANG ZH, SHEN H, ADAM RD, LU SQ. 2010. Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM. *Parasitol Res*, 106(4):789-93
- TOVAR J, LEÓN-AVILA G, SÁNCHEZ LB, SUTAK R, TACHEZY J, VAN DER GIEZEN M, HERNÁNDEZ M, MÜLLER M, LUCOCQ JM. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*. 426(6963):172-6.
- TŮMOVÁ P, HOFSTETROVA K, NOHYNKOVA E, HOVORKA O, KRAL J. 2007. Cytogenetic evidence of diversity of two nuclei within a single diplomonad cell of *Giardia*. *Chromosoma* 116: 65-78.
- TŮMOVÁ P, UZLÍKOVÁ M, JURCZYK T, NOHYNKOVA E. 2016. Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *Microbiology Open*. 1-15. doi: 10.1002/mbo3.351
- UPCROFT J, UPCROFT P. 1998. My favorite cell: *Giardia*. *BioEssays* 20: 256-263.
- VÁZQUEZ-ECHEVERRÍA C, ZAVALA G, CHÁVEZ B, ECHEVERRÍA-MARTÍNEZ OM, VÁZQUEZ-NIN GH. 2009. Evidencia Ultraestructural del Nucléolo de *Entamoeba histolytica*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 12: 34-37.
- VÁZQUEZ-TSUJI O, CAMPOS-RIVERA T. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 8(31): 75-90.
- VISINTIN R, AMON A. 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol*, 12(3):372-7
- WIESEHAHN G P, JARROLL EL, LINDMARK DG, MEYER EA, HALLICK LM. 1984. *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Exp Parasitol*, 58:94-100.
- YANG CY, ZHOU H, LUO J, QU LH. 2005. Identification of 20 snoRNA-like RNAs from the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 328(4):1224-31.
- YU LZ, BIRKY CW JR, ADAM RD. 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot Cell*, (2):191-9.

PÁGINAS WEB:

http://www.sciencephoto.com/image/364903/530wm/Z1000192-Giardia_lambliia_protozoan,_TEM-SPL.jpg

<http://GiardiaDB.org>