



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Obtención de la proteína recombinante 5800 de unión a lípidos en *Giardia intestinalis*, que se sobre-expresa en la interacción huésped-parásito *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DIANA FERRUSCA DOMÍNGUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
BIÓL. MARIO NOÉ MARTÍNEZ GORDILLO
CIUDAD DE MÉXICO, 2018.**



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.



FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Obtención de la proteína recombinante 5800 de unión a lípidos en *Giardia intestinalis*, que se sobre-expresa en la interacción huésped-parásito *in vitro*

realizado por **Diana Ferrusca Domínguez** con número de cuenta **309114293** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Martha Ponce Macotela

Propietario Dr. en C. B. Horacio Reyes Vivas

Propietario Biól. Mario Noé Martínez Gordillo
Tutor

Suplente Dra. Ana Lucía Sereno Uribe

Suplente Dra. Itzel Sigala Regalado

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 2 DE AGOSTO DE 2018

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*A mi madre Laura,
extraordinaria mujer y ejemplo de vida.*

*A mi hermano Eduardo,
por cada uno de los momentos que hemos vivido.*

*A Sully,
persona clave en mi vida.
Por el cariño, ánimo y la seguridad brindada.*

*A Sres. Vicky y José,
Por su apoyo otorgado.*

*A la Biól. Nayeli,
excepcional persona de lucha y constancia.*

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Laura Domínguez García, por su amor incondicional, por cada uno de sus esfuerzos, por las noches de desvelo y su inquebrantable espíritu. Por ser mi ejemplo a seguir, por cada una de sus enseñanzas, cuya admiración y respeto, no tiene límites.

A la Biól. Surya González Jaramillo, por los sensacionales años, mi compañera incesante. Por las ilusiones y travesuras compartidas, por las largas pláticas, por hacerme participe de su día a día, por su apoyo absoluto y por ser una maravillosa persona de la que he aprendido mucho.

A los Sres. Virginia Jaramillo Ordoñez y José González López, por acogerme como un miembro más de su familia, por su constante preocupación y ayuda tenaz.

Al Biól. Mario Noé Martínez Gordillo, a quien le estoy profundamente agradecida, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él, y por las enseñanzas múltiples a lo largo de proyecto.

A la Dra. Martha Ponce Macotela, por aceptarme en el laboratorio, por todo el conocimiento brindado y contribuir a mi desarrollo académico.

Al M. en C. Aarón Rodríguez Caballero, por el tiempo y la paciencia. Muchas gracias por el constante apoyo y las enseñanzas.

A Gustavo Peralta Abarca, porque siempre estuvo en la mejor disposición de ayudarme e instruirme en cuestiones técnicas y por las charlas amenas.

A la Biól. Nayeli González Mateos, por su empeño, paciencia e inspiración hacia su trabajo. Por las grandes enseñanzas de vida y el tiempo compartido.

A mi jurado, el Dr. Horacio Reyes Vivas, por la ayuda durante la purificación de la proteína. La Dra. Itzel Sigala Regalado, por las admirables clases, así como la revisión del manuscrito y a la Dra. Ana Lucía Sereno Uribe por los comentarios que enriquecieron el escrito final.

Al laboratorio de Parasitología Experimental de la Torre de Investigación, del Instituto Nacional de Pediatría, por permitirme realizar mi proyecto de investigación. Así como a la M. en C. Silvia Caballero Salazar y la M. en C. Yadira González Rufino.

A mis compañeros del taller “Estudio biológico y molecular de los parásitos de importancia médica”, Daniel Amézquita y Cecilia Molina.

A mis amigos y profesores a lo largo de la carrera.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Definición y aspectos históricos.....	2
1.2 Taxonomía	2
1.3 Morfología	3
1.3.1 Trofozoito.....	3
1.3.2 Quiste	5
1.4 Especies y ensamblés	6
1.5 Ciclo biológico	7
1.5.1 Cultivo <i>in vitro</i>	9
1.6 Mecanismos patogénicos	9
1.7 Manifestaciones clínicas.....	12
1.8 Diagnóstico	12
1.9 Tratamiento.....	14
1.10 Epidemiología.....	17
1.11 Prevención.....	18
1.12 Antecedentes	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
4. HIPÓTESIS	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Cultivo y mantenimiento de los trofozoítos	22
5.2 Obtención de ácidos nucleicos	22
5.3 Secuencia del gen 5800	23
5.4 Amplificación del gen 5800 de <i>Giardia intestinalis</i> mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
5.4.1 Electroforesis en gel de agarosa para la detección del producto de la PCR del gen 5800	25
5.5 Restricción del producto de la PCR mediante la enzima <i>RsaI</i>	25
5.6 Restricción del producto de la PCR mediante la enzima <i>BglI</i>	27
5.7 Clonación del amplicón de 807 pb en el vector pET 151/D-TOPO	28
5.7.1 Transformación en <i>E. coli</i> One Shot TOP 10.....	29

5.7.2 Extracción de DNA plasmídico para transformación en BL21	29
5.7.3 Identificación de clones recombinantes pET151-5800 por PCR del gen 5800 ..	30
5.8 Transformación en BL21 Start (DE3)	30
5.8.1 Preparación de muestras BL21	31
5.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	32
5.9 Purificación de la proteína de 29 kDa por cromatografía de afinidad a Ni-NTA.....	32
5.10 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la proteína recombinante	34
5.10.1 Inmunodetección del antígeno	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Cuantificación y pureza de DNA.....	36
6.2 Integridad del DNA	36
6.3 Amplificación del gen 5800 de <i>Giardia</i> mediante PCR.....	37
6.4 Productos de la restricción del gen 5800 con la endonucleasa <i>RsaI</i>	38
6.5 Productos de la restricción del gen 5800 con la endonucleasa <i>BglI</i>	39
6.6 Colonias de <i>E. coli</i> One Shot TOP 10 con el plásmido	40
6.6.1 DNA del plásmido.....	41
6.6.2 PCR del DNA obtenido del pET151-5800	42
6.7 Colonias de bacterias BL21 Start (D3) de expresión	43
6.7.1 SDS-PAGE para las proteínas expresadas en BL21	43
6.8 Detección de proteína purificada en gel de acrilamida.....	44
6.9 Inmunodetección de la proteína recombinante en antígenos de <i>Giardia intestinalis</i> del aislado HGINV	45
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	52
10. ANEXO	53
11. REFERENCIAS	65

Ferrusca-Domínguez, D. 2018. Obtención de la proteína recombinante 5800 de unión a lípidos en *Giardia intestinalis*, que se sobre-expresa en la interacción huésped-parásito *in vitro*. Ciudad de México, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 77 pp.

RESUMEN

Giardia es un parásito zoonótico y cosmopolita, produce diarrea, mala absorción y déficit intelectual en humanos. En un modelo de interacción huésped-parásito *in vitro* se determinó que hay genes que se sobre-expresan. Recientemente se obtuvo un aislado de *Giardia* con capacidad de invadir el epitelio intestinal. Se sabe poco de la giardiasis intraepitelial; por esta razón, es imperativo generar herramientas moleculares para discriminar entre aislados invasores de los no invasores.

El objetivo de este trabajo fue obtener la proteína 5800 de unión a lípidos recombinante, a partir del gen GL50803_5800 que se sobre-expresa en la interacción huésped-parásito *in vitro*.

El DNA del aislado invasor (INP220806-HGINV) se aisló y cuantificó. El gen de 807 pb se amplificó con los primers MG5800F y MG5800R. La identidad del gen se comprobó mediante patrones de restricción con las endonucleasas *RsaI* y *BglI*. El amplicón se clonó en pET151/D-TOPO y se expresó en *E. coli* BL21 Start. La proteína se aisló y purificó mediante cromatografía de afinidad (Ni-NTA). El segmento de His₆ se digirió con una proteasa. La proteína recombinante tiene un peso de 29 kDa. Dos ratones de la cepa BALB/c se inmunizaron vía intraperitoneal con 30 µg de proteína en adyuvante completo de Freund y tres refuerzos. La inmunodetección mediante ELISA, mostró que los anticuerpos reconocieron los antígenos del aislado invasor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y aspectos históricos

Giardia intestinalis (sinonimia: *G. lamblia*, *G. duodenalis*) es un protozooario parásito muy exitoso. La primera descripción se atribuye a Anton Van Leeuwenhoek en 1681, quien la observó en sus heces diarreicas. Vilém D. Lambl 1859, describe al organismo a detalle y lo clasifica en el género *Cercomonas*. En 1883, Kunstler describe un organismo en renacuajos y lo clasifica en el nuevo género *Giardia*. Kofoid y Christiansen proponen el nombre de *Giardia lamblia* y posteriormente *G. entérica* (Hegner, 1926; Adam, 2001).

El género exhibe una notable especificidad ya que varias especies de mamíferos hospederos, parecen estar parasitados por su propia especie peculiar de *Giardia*. Con base en criterios morfológicos y especificidad huésped-parásito se describen más de 40 especies de *Giardia*. En 1952, Filice, hace una síntesis, registra a detalle la morfología del parásito y detalla tres especies: *G. duodenalis* en el humano, *G. muris* en pájaros y roedores y *G. agilis* en anfibios (Hegner, 1926; Adam, 2001).

1.2 Taxonomía

En el 2015, se publicó una clasificación de consenso encabezada por Michael A. Ruggiero (Ruggiero *et al.*, 2015) que involucra a más de 1.6 millones de especies en lo que se conoce como Catálogo de la vida. *Giardia* pertenece al Phylum

Metamonada por presentar flagelos y carecer de mitocondrias, se encuentra dentro del orden Diplomonadida por ser bilateralmente simétrico con dos núcleos.

La ubicación de *Giardia* es la siguiente:

Supereino: Eucariota

Reino: Protozoa

Subreino: Eozoa

Infrareino: Excavata

Phylum: Metamonada

Clase: Eopharyngia

Orden: Diplomonadida

Familia: Giardiidae

Género: *Giardia*

Especie: *G. intestinalis* (*G. lamblia*, *G. duodenalis*)

1.3 Morfología

G. intestinalis presenta dos estadios durante su ciclo de vida. El trofozoíto es la forma trófica del parásito y es la que produce las manifestaciones clínicas, y el quiste es la estructura de resistencia y transmisión.

1.3.1 Trofozoíto

El trofozoíto es piriforme, mide entre 10-20 μm de largo, por 5-15 μm de ancho y 2-4 μm de grosor. Posee simetría bilateral, cóncava ventralmente y convexa dorsalmente. Presenta dos núcleos, cuerpo medio, cuerpos basales, vacuolas periféricas, posee ocho flagelos: dos anteriores, dos posteriores y cuatro laterales. Los flagelos surgen de un cuerpo basal, con axonemas que tienen la estructura

típica de 9+2. El disco suctor se encuentra en la región anteroventral, compuesto por dos lóbulos unidos a la altura de los núcleos; el disco es contráctil. El citoesqueleto está compuesto por proteínas (tubulina y giardina) que le permiten al organismo adherirse al epitelio intestinal de su hospedero. El movimiento es unidireccional y en forma de balanceo, lo cual hace al trofozoíto característico cuando se observa en un examen directo en fresco bajo el microscopio (Fig. 1) (Tay y Velasco, 2002; Noemí, 2013; Ponce-Macotela y Martínez-Gordillo, 2014).

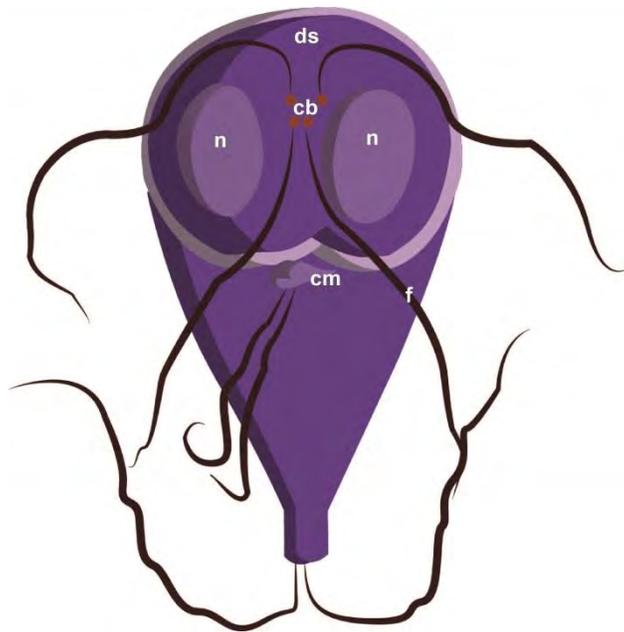


Figura 1. Esquema del trofozoíto de *Giardia intestinalis*. Se observan los núcleos (n), disco suctor (ds), cuerpos basales (cb), cuerpo medio (cm) y flagelos (f).

1.3.2 Quiste

El quiste es ovoide, mide de 8-12 μm de longitud, 7-10 de ancho y está cubierto por una pared de 0.3-0.5 μm de grosor. En la fase inmadura se ven dos núcleos y en su forma madura presenta cuatro núcleos; el citoplasma es granular fino y separado de la pared quística. En el proceso de enquistamiento los trofozoítos desensamblan su disco suctor, retraen sus flagelos, el citoplasma se condensa y producen proteínas de pared quística (Fig. 2) (Faust *et al.*, 1979; Gómez, 2010; Ponce-Macotella y Martínez-Gordillo, 2014).

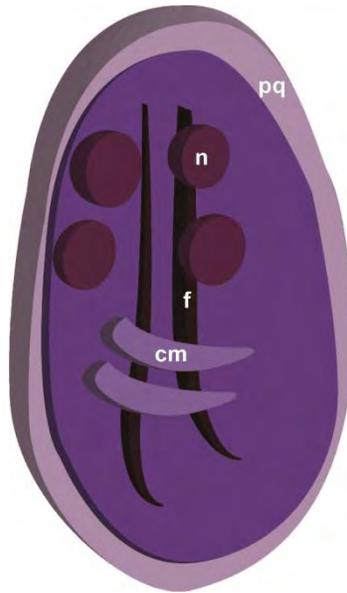


Figura 2. Esquema del quiste de *Giardia intestinalis*. Se observan los núcleos (n), pared del quiste (pq), cuerpo medio (cm) y flagelos (f).

1.4 Especies y ensamblajes

Filice (1952) clasificó a *Giardia* de acuerdo a la morfología de los trofozoítos y la forma de sus cuerpos medios. Los agrupó en tres especies: *G. agilis* en anfibios, con trofozoítos más largos que anchos y cuerpos medios en forma de lágrima; *G. muris* en roedores, con trofozoítos casi esféricos y cuerpos medios pequeños y redondeados; *G. duodenalis* en mamíferos incluido el hombre, con trofozoítos piriformes con cuerpos medios que se asemejan a la forma de la uña de un martillo.

Posteriormente se describieron tres especies del grupo morfológico duodenalis, en aves *G. ardea* que solamente presenta un flagelo caudal, *G. psittaci* que bajo el microscopio electrónico no presenta flanco ventrolateral, y en roedores se describió a *G. microti* que se caracteriza porque los quistes presentan dos trofozoítos (Thompson y Monis, 2004).

Debido a que los trofozoítos y quistes del grupo morfológico *G. duodenalis* son similares, se han utilizado técnicas bioquímicas y moleculares para poder discriminarlos; actualmente, se han descrito ocho ensamblajes/genotipos (A-H), (Monis *et al.*, 2009; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010). Los ensamblajes A y B se han dividido en grupos genéticos, denominados AI y AII, y BII y BIV (Monis *et al.*, 1996; Monis *et al.*, 1999). La Tabla 1 resume los ensamblajes, grupos genéticos y hospederos.

Hasta ahora se han sometido a secuenciación y análisis tres ensamblajes de *Giardia intestinalis* (AI, AII y BIV), infecciosos para el humano. Su genoma de

aproximadamente 12 MB se encuentra distribuido en cinco cromosomas (Morrison *et al.*, 2007; Adam *et al.*, 2013).

Tabla 1. Ensamblajes y hospederos de *Giardia*

Ensamble	Grupo genético	Hospedero
A	AI	Humanos y otros mamíferos
	AII	
B	BII	Humanos y otros mamíferos
	BIV	
C		Cánidos
D		Cánidos
E		Ganado vacuno, ovino, porcino, equino y
F		Felinos
G		Ratas
H		Mamíferos marinos

1.5 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *G. intestinalis* incluye los estadios de trofozoíto y quiste. La fase infectante es el quiste y la dosis mínima para establecer la infección es de 10 quistes. El mecanismo de infección es por fecalismo directo: ano-mano-boca, e indirecto por ingestión del agua y/o alimentos contaminados, por fómites o por forosis. El desenquistamiento se induce al exponerse al pH ácido del estómago, y se desenquistan en el duodeno, debido al cambio del ambiente ácido del estómago al pH neutro o ligeramente alcalino del duodeno, dando origen a trofozoítos tetranucleados, los cuales se dividirán en trofozoítos binucleados; en

ocasiones emerge un trofozoíto tetranucleado en proceso de división binaria. Los trofozoítos se multiplican, se adhieren a la mucosa por medio de su disco suctor y colonizan el duodeno e íleon. El proceso de enquistamiento se inicia debido al cambio de pH y la disminución de colesterol. Dado que los quistes no pueden adherirse se eliminan con la materia fecal. Los quistes pueden sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente bajo condiciones frescas y húmedas, pero son susceptibles a la desecación y la luz solar directa (Fig. 3) (Rendtorff, 1954; Erlandsen *et al.*, 2002; Vázquez y Campos, 2009

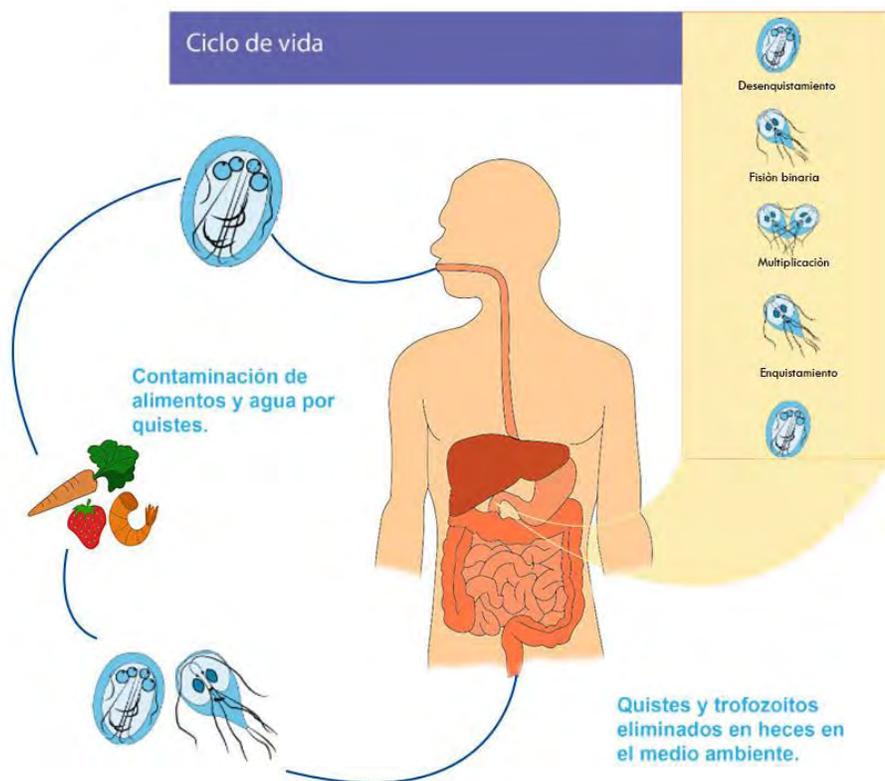


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *Giardia*.

1.5.1 Cultivo *in vitro*

El precursor de los cultivos de *Giardia* fue Karapetyan (1962), su medio de cultivo era monoxénico e incluía suero, extracto de embrión de pollo, digerido de carne y solución Earle o Hank; adicionalmente, presentaba *Candida guilliermondii* y fibroblastos de pollo. El medio se cambiaba diariamente, porque los fibroblastos morían. Posteriormente, se substituyó a *C. guilliermondi* por *Saccharomyces cerevisiae*.

En 1970, Meyer reportó un cultivo axénico de trofozoítos de *Giardia*, preparado con solución de Hank, peptona y cisteína.

El medio TPS-1 introducido por Diamond (1968) para el cultivo de *Entamoeba histolytica* se modificó con triptona, lo que permitió el crecimiento de *Giardia*.

En 1978, Diamond y otros investigadores, introducen el medio TYI-S-33 para el cultivo de *E. histolytica*, y en 1983 Keister, Farthing y otros, determinaron que el medio TYI-S-33 con bilis de bovinos promovía el crecimiento de trofozoítos de *Giardia* (Radulescu y Mayer, 1990).

1.6 Mecanismos patogénicos

La adhesión de los trofozoítos de *Giardia* al epitelio intestinal, involucra estructuras especializadas, como el disco suctor, la cresta lateral, proteínas contráctiles y lectinas, entre otros. La interacción de lectinas con el epitelio intestinal produce

exfoliación, lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades. *Giardia* tiene una lectina que se une a un receptor de membrana, induciendo alteraciones del epitelio intestinal (Farthing *et al.*, 1986; Lev *et al.*, 1986). La Alpha-1 giardina es una proteína inmunodominante de *Giardia* que está relacionada con las anexinas y proporciona un mecanismo de unión al epitelio (Weiland *et al.*, 2003; Weeratunga *et al.*, 2012). La adhesión de los trofozoítos a la mucosa intestinal provoca la alteración de solutos (iones de cloruro y sodio, glucosa, proteínas), disposición anormal de moléculas involucradas con el citoesqueleto (α -actinina, miosina F-actina) y ruptura de uniones intercelulares (claudina, ZO-1) que conduce a la activación de la señalización apoptótica; la interacción del disco suctor con los enterocitos genera lesiones en las microvellosidades del epitelio (Erlandsen *et al.*, 1988; Bazán-Tejeda *et al.*, 2010).

En cuadros clínicos crónicos se ha observado una disminución de la superficie de las microvellosidades intestinales, por tanto, conduce a la reducción de la absorción de sodio-glucosa, provocando una pérdida de la función de la barrera intestinal lo que conduce a diarrea (Troeger *et al.*, 2007; Bazán-Tejeda *et al.*, 2010).

Las sales biliares contribuyen al ciclo de vida de *Giardia*, se ha demostrado, que la presencia de bilis a bajas concentraciones, estimula el crecimiento del parásito y reduce el tiempo de cada generación, siendo un importante factor de colonización. Los trofozoítos compiten con el hospedero por sales biliares y la disminución de éstas aportan a la malabsorción, deteriorando la solubilización micelar (Farthing *et al.*, 1985). *Giardia* también compete con las células epiteliales

por la arginina, sustrato crucial utilizado por la óxido nítrico sintetasa (NOS) para formar óxido nítrico (NO), al tomar arginina inhibe la producción de NO, lo que facilita la colonización de intestino delgado humano (Eckmann *et al.*, 2000).

Además, el parásito presenta variación antigénica, por medio de proteínas variables de superficie (VSP), en su genoma se encuentran 150 a 200 genes que codifican para estas proteínas y solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en cierto momento. Estas proteínas tienen un dominio transmembranal altamente conservado y una porción carboxilo-terminal citosólica que comprende 5 aminoácidos (CRGKA), son proteínas ricas en cisteína, se unen a zinc y otros metales pesados; la coordinación del metal estabiliza las VSP, provocando resistencia al ataque proteolítico en el intestino delgado e inhibe la absorción de zinc o hierro, y evade la respuesta inmune del hospedador (Pimenta *et al.*, 1991; Luján *et al.*, 1995; Singer *et al.*, 2001).

Giardia produce apoptosis en enterocitos dependientes de la caspasa-3, se correlaciona con la ruptura de uniones celulares a nivel de ZO-1 y un incremento en la permeabilidad epitelial, además la interacción de los trofozoítos y las células epiteliales produce hiperplasia en las células caliciformes, lo cual es, perjudicial para la barrera epitelial (Chin *et al.*, 2002; Ponce-Macotela *et al.*, 2008).

1.7 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas asociadas con la giardiasis son variables, se presentan individuos asintomáticos y sintomáticos. La infección asintomática ocurre tanto en adultos como en niños, estos últimos son más susceptibles a la infección por su sistema inmune, por sus actividades y juegos, lo que facilita la transmisión (Pickering *et al.*, 1984; Eckmann y Gillin, 2001; Donowitz *et al.*, 2016; Quigui-Cota *et al.*, 2017).

La forma sintomática presenta un amplio espectro manifestaciones y se divide en giardiasis aguda y giardiasis crónica; en la aguda los síntomas se desarrollan después de un periodo de incubación que va de 7 a 14 días, y pueden durar de dos a cuatro semanas. Los síntomas incluyen: diarrea, malestar, heces con mal olor, dolor abdominal transperidial, flatulencia, náuseas, pérdida de peso, vómito, fiebre, estreñimiento y urticaria (Hill y Nash, 2011).

La giardiasis crónica puede seguir de la fase aguda o se desarrolla en ausencia de la fase aguda, algunos de los síntomas presentes son: heces diarreicas, esteatorrea, pérdida de peso, mala absorción de nutrientes, sales minerales y vitaminas A y B12, malestar, fatiga, depresión, cólico abdominal, flatulencia, etc. (Singh *et al.*, 2000; Buret, 2007; Cantey *et al.*, 2011).

1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la giardiasis se realiza de diferentes maneras, la más usual es mediante los análisis coproparasitológicos (CPS) para la identificación de

trofozoítos y quistes. También existen métodos de diagnóstico indirecto; tales como los inmunológicos y moleculares (Soares y Tasca, 2016).

En la fase aguda los pacientes con diarrea, generalmente se eliminan trofozoítos y pocos quistes; por esta razón, se indica el examen directo en fresco para la búsqueda e identificación de trofozoítos de *Giardia* (Vázquez y Campos, 2009).

Los CPS cualitativos de concentración-flotación, son útiles porque concentran las estructuras de resistencia. Además, las muestras pueden procesarse frescas o fijadas con acetato de sodio ácido-acético-formaldehído (SAF), acetato de sodio-ácido acético-formol (PAF) o alcohol-polivinílico (PVA). Estos métodos proporcionan 96% de rendimiento si se procesan tres muestras (De Haro, 1995; Noemí, 2013).

Existen otras estrategias de diagnóstico cuando no se encuentran quistes de *Giardia*, pero el cuadro clínico sugiere esta parasitosis. Estos métodos especiales son invasivos, por ejemplo, el aspirado y biopsia duodenal (Noemí, 2013).

La necesidad de métodos indirectos rápidos y sencillos estimuló el desarrollo del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de coproantígenos de *Giardia* (Rodríguez y Rivera, 2011). Las pruebas inmunológicas son un método importante. Existe un estuche (kit) de ELISA que reconoce el antígeno GSA-65 en heces; se ha visto que se encuentra en menores concentraciones en el trofozoíto que en los quistes de *Giardia*, además este

antígeno es estable bajo un almacenamiento prolongado de entre 4° a -20°C y resistente a enzimas proteolíticas (Rosoff y Stibbs, 1986 a, b). Se ha reportado que este estudio tiene una sensibilidad del 99% lo que representaría una buena alternativa de costo-beneficio (Cacció, 2004).

Las técnicas moleculares son herramientas para identificar a *Giardia intestinalis*, son efectivas y ampliamente utilizadas; además ofrecen la diferenciación nivel especie y genotipo. La mayoría están basados en el análisis de la subunidad del RNA ribosómico (SSU-rRNA), β -giardina (bg), glutamato deshidrogenasa (gdh), factor de elongación 1-alfa (ef-1), triosa fosfato isomerasa (tpi), y las proteínas variables de superficie (vsp) (Cacció, 2008; Rayani *et al.*, 2013).

1.9 Tratamiento

Para el tratamiento de la giardiasis hay medicamentos que deben administrarse tanto en pacientes con giardiasis asintomática como sintomática. Sin embargo, los agentes presentan efectos adversos o hay cepas resistentes (Gardner y Hill, 2001).

En Tabla 2 se muestran algunos fármacos para el tratamiento de la giardiasis.

Tabla 2. Agentes antimicrobianos para el tratamiento de la giardiasis

Compuesto	Ejemplo	Mecanismo de acción
Acridinas	Quinacrina	Intercalación de DNA Inhibición de la síntesis de DNA
Quinolinas	Cloroquina	Desconocido
Nitrofuranos	Furazolidona	Inactivación del DNA/proteínas blanco
Aminoglucósidos	Paromomicina	Posiblemente inhibición de la síntesis de proteínas
Nitroimidazoles	Metronidazol, tinidazol	Inactivación del DNA/proteínas blanco
Benzimidazoles	Albendazol, mebendazol	Unión a tubulina, interferencia con citoesqueleto Inactivación del DNA/proteínas
Nitrotiazoles	Nitazoxanida	blanco

Tabla modificada de Watkins y Eckmann (2014)

El metronidazol y la furazolidona, producen radicales tóxicos; la resistencia del primero se correlaciona negativamente con la concentración intracelular de piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR), conduciendo a una disminución en la captación de metronidazol libre, mientras que la resistencia a la furazolidona se debe a un aumento en las enzimas cicladoras de tiol (Upcroft *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 2011).

Los compuestos nitroheterocíclicos ingresan a la célula por difusión pasiva e inducen estrés oxidativo, dañando proteínas y el DNA (Leitsch *et al.*, 2012). *Giardia* utiliza una elaborada red antioxidante para proteger las metaloenzimas sensibles al oxígeno incluyendo PFOR, ferredoxina y nitroreductasas que contienen ferredoxina, enzimas que están implicadas en el metabolismo de nitroheterocíclicos. La inhibición funcional de enzimas oxidorreductasas es importante para la resistencia (Upcroft *et al.*, 1990; Ansell *et al.*, 2015).

Otros tratamientos alternativos a los que se han recurrido, debido a la resistencia de las cepas y efectos secundarios de los fármacos, son los metabolitos secundarios producidos por plantas. Se ha demostrado que algunas especies tales como *Castela tortuosa* (chaparro amargoso), *Plantago major* (orejas de burro), *Justicia spicigera* (Moyotle), *Haematoxylon campechianum* (Palo de tinte), *Lippia graveolens* (orégano), entre otros, inhiben el crecimiento de *Giardia* (Ponce-Macotela *et al.*, 1994). Ponce-Macotela *et al.* (2006) mostraron que el extracto de *Lippia graveolens*, resultó más potente que el tinidazol. Los trofozoítos perdieron su tamaño, forma y mostraron un daño en la estructura del núcleo. Esto muestra que un enfoque etnofarmacológico, también es importante contra la actividad giardicida.

1.10 Epidemiología

Giardia tiene distribución cosmopolita, es el parásito protozoario intestinal más común, tanto en países en desarrollo, como en países desarrollados. En Asia, África y América Latina, se estima que cerca de 200 millones de personas padecen giardiasis sintomática, con 500,000 nuevos casos cada año (WHO, 1996; Lane y Lloyd, 2002). Para la Unión Europea se confirmó 5.3 casos por 100,000 habitantes, los países con mayor índice pertenecieron a Reino Unido y Alemania (ECDC, 2015). La giardiasis es una parasitosis zoonótica re-emergente (Thompson, 2000). Se define a las zoonosis como enfermedades de animales que se transmiten a humanos y enfermedad re-emergente al aumento de incidencia en los últimos años (Schmitt y Roberts, 1985; Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001).

Debido a su alta prevalencia la giardiasis se ha incluido dentro de las enfermedades desatendidas (Savioli *et al.*, 2006). Sin embargo las estimaciones varían mucho, porque la enfermedad solo tiene registro obligatorio en algunos países. En nuestro país, muchas enfermedades parasitarias no tiene dicho registro, además el diagnóstico puede diferir en sensibilidad y la infección puede ser asintomática (Caccio y Sprong, 2011).

En el 2015 en México se reportaron 63 722 casos de giardiasis, siendo Sinaloa y Yucatán los estados con mayor frecuencia de esta parasitosis (Quezada y Ortega, 2017).

1.11 Prevención

Las medidas preventivas incluyen: el lavado de las manos antes de ingerir alimentos y desinfección de los mismos. Evitar alimentos crudos, consumir líquidos embotellados o ebullición para potabilización de agua. Por otra parte se requiere de la eliminación adecuada de los desechos de humanos y animales (Hill, 1993; Gascón, 2001).

1.12 Antecedentes

Son escasos los reportes de invasión de los trofozoítos de *Giardia intestinalis* al epitelio intestinal (Brandborg *et al.*, 1967; Morecki y Parker, 1967; Saha y Ghosh, 1977; Fleck, 1985; Sinelnikov *et al.*, 2009). Martínez-Gordillo *et al.* (2014) reportaron un caso que demuestra en una biopsia de un paciente con dolor abdominal y malabsorción de lactosa, trofozoítos de *G. intestinalis* por debajo del epitelio intestinal. A partir de las heces lograron aislar quistes, permitiendo tener trofozoítos *in vitro* y mantenerlos en cultivo, también se genotipificó y perteneció al ensamble A, grupo genético A2, y se designó como aislado HGINV (Humano *Giardia*, INVasora). Sin embargo, no se sabía si después de crecer en cultivo mantendría esta capacidad. Por esta razón, se reprodujo la infección en un modelo *in vivo*. Se inocularon gerbos (*Meriones unguiculatus*) con el aislado invasivo (HGINV) y se usó como control el aislado WB: se observó que existen aislados invasores como el aislado HGINV que mantuvo su propiedad invasiva y aislados que no tienen capacidad invasora como el aislado WB. El trabajo sugiere que los pacientes con esteatorrea, dolor abdominal y malabsorción de lactosa podrían albergar trofozoítos invasivos (Reynoso-Robles *et al.*, 2015).

El trabajo de Ringqvist *et al.* (2011) muestra una serie de 30 genes que se sobre-expresan en la interacción células epiteliales intestinales (células Caco2) y trofozoítos de *G. intestinalis* del aislado WB, en diferentes tiempos 1.5, 6 y 18 horas, uno de esos genes más altamente sobreexpresado a las 18 horas, fue el 5800, que contiene un dominio a unión a lípidos y un peso de 29 kDa.

2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este trabajo radica en que, dada la poca información que existe sobre el aislado invasor de *Giardia intestinalis*, es esencial coadyuvar al diseño de herramientas moleculares, con la finalidad de generar conocimientos entre un aislado invasor de uno no invasor, y conocer la interacción huésped-parásito.

3. OBJETIVO

Obtener una proteína recombinante a partir del gen 5800 de unión a lípidos, que se sobre-expresa en la interacción huésped-parásito *in vitro* (células Caco2-*Giardia*) a partir del aislado HGINV (invasor).

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar la presencia de la proteína 5800 en aislado HGINV, mediante inmunodetección.

4. HIPÓTESIS

Dado que se ha documentado que los trofozoítos de *Giardia* (no invasiva) tiene un gen que codifica a una proteína de aproximadamente 29 kDa que se une a lípidos, se espera que los trofozoítos invasivos también tendrán este gen.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cultivo y mantenimiento de los trofozoítos

Los trofozoítos de *Giardia* del aislado INP220806-HGINV se crecieron en medio TYI-S-33 (Ponce-Macotella *et al.*, 1990) a 37°C. Para su mantenimiento cada 36 hrs., se obtuvo una alícuota de 200 µL y se sembró en medio nuevo.

5.2 Obtención de ácidos nucleicos

Los tubos con trofozoítos en fase log, se incubaron a 4 °C/10 min. para desadherir a los trofozoítos de las paredes de los tubos; posteriormente, se centrifugaron a 3500 rpm/15 min. Los trofozoítos se cosecharon, para eliminar los residuos del medio de cultivo se lavaron dos veces con solución salina de fosfatos 7.2 (PBS) y se pusieron en un tubo Eppendorf.

Para obtener los ácidos nucleicos, se les agregó 300 µL de la solución de lisis (anexo) y 20 µL de proteinasa K (10mg/mL) (anexo) y se incubaron a 56°C toda la noche. Posteriormente, a la muestra contenida en el tubo se le agregó fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (50:49:1), se mezcló suavemente durante 10 min. y se centrifugó 12000 rpm/4°C/10 min., se obtuvo el sobrenadante (sin tocar el fenol) y se depositó en otro tubo Eppendorf, se realizaron otras dos extracciones fenólicas y una última con cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 1000 µL de etanol absoluto a -20°C y una décima de acetato de sodio 3M, el tubo se mantuvo a -20°C durante toda la noche. El tubo se centrifugó 12000 rpm/4°C/10 min., el etanol se decantó y el precipitado se resuspendió en 30 µL Tris/EDTA (TE) (anexo).

Para eliminar el RNA de la muestra, ésta se trató con 10 µL de RNAsa (10mg/mL) (anexo) y se incubó a 37°C/30 min. Posteriormente, se realizó una extracción fenólica (fenol/cloroformo/alcohol isoamílico), se centrifugó a 12000 rpm/4°C/10 min., se obtuvo el sobrenadante, se precipitó con acetato de sodio 3 M y etanol absoluto a -20°C y se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm/4°C/10 min., se decantó y el precipitado se resuspendió en 30 µL TE.

La pureza y concentración del DNA se midió en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad se determinó mediante electroforesis; en un matraz se colocaron 30 mL de TBE 1X (anexo) y 300 mg de agarosa. La agarosa se fundió y se añadió 1 µL (10 mg/mL) de bromuro de etidio, se mezcló y vertió en el molde para la electroforesis. Se dejó solidificar a 4°C/30 min. El molde se colocó en la cámara y se añadió TBE 1X. A 1.0 µL de muestra se le agregaron 3 µL del amortiguador de carga (anexo) y se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se corrió a 60 volts, 30 mA y 1:30 hrs. Las bandas de DNA se observaron en un transiluminador de UVP (Bioimaging Systems) y se registraron.

5.3 Secuencia del gen 5800

La secuencia del gen que codifica a la proteína 5800 se obtuvo del genbank:

```
ATGCTTTCTTTAAATAAAATGCCGCTTTTCAAGGGCACCATTCCGCAGGACAG
CTGGGCCGATATCAGGAGCGTGGGTTCCAAGGGCCTTGAGCATGCGCTGAA
GCTCCTCACCATCGTCCTGGGGCGACCCAAAGGTTCGAGGAGGGGCTTAC
GACGACGACTACCAAGGTTCGAGGGCAGCAAGATGGTGGCTCTCAAGGCCGA
```

GCTCGAGATTCCCTACCCCATCCAGAGCTGCATCGCGTGCCTCTACGGGAAC
ATCGATGTGATGAGAGTTCACCGGCCGAGGCTCGTGAGAAGTACCCGTTTC
GCAAGGCACACTGGTCCTCGAAGGAGGATGAGGCTCACTCCCAGAAGATCCA
CGACTACATCGACCCAAAGACGTACGACAGCGTTGAAGGCGGGCAGCCGAG
TACGACCTCACTGCCCTGGTCCATTACGTTGTTGCCTCGCCGTCCTCGATTGT
CGCTCCACGCGAGTTCATCACCGTGCGGGTTTGCCGCGAAGTCGAGAAGGT
CGATGGCAGACGTGCTCTCTGCGTCGCGAACACTTCGTGGCAGCCAGCGAAT
CTAGCAGAGATCATCCCCGAAGCCACAAAGGCTGAGAAGTGGGTCCGCGCC
ATTGTGCATGCCAGCTCTTTGTCTTCGAGGAGACAGCGCCCGGGAGTGGCA
AGACTAAGGCGACGTTTCATGGTCCATACGGATCCGTGTGGGAATGTCCCTGC
AATGATTGCCAACAAGGTCATCATCCATCAGGCCTCAACGCTTACCAGCATCA
AGACGACTCTAGAGAAGCTCCTTAAGTAG

5.4 Amplificación del gen 5800 de *Giardia intestinalis* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se diseñó los oligonucleótidos para amplificar el gen 5800 que tiene 807 pb y corresponde a la proteína hipotética con dominio start de unión a lípidos.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:
MG5800F 5'CACCATGCTTTCTTTAAATAAAATGCCGCTTTTCAAGGGC-3' y
MG5800R 5'-CTACTTAAGGAG CTTCCTACTAGAGTCGT-3'.

La mezcla maestra de reacción contenía 147 μL de agua estéril; 20 μL de GeneAmp 10X PCR Gold Buffer; 10 mM de dNTP's; 10 μM de cada oligonucleótido; 2.5 U/ μL de AmpliTaq Gold DNA polymerase; 2 mM de MgCl_2 y 50 ng de DNA de *G. intestinalis* aislado HGINV. El volumen final de cada PCR fue de 50 μL .

El gen se amplificó en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems), con el programa 5800LB bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C/10 min., 30 ciclos a 95°C/20 seg., 55°C/20 seg. y 72°C/1.20 min. y un ciclo de extensión 72°C/7 min.

5.4.1 Electroforesis en gel de agarosa para la detección del producto de la PCR del gen 5800

Los amplicones se identificaron en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X y 1 μL (10 mg/ μL) de bromuro de etidio. Las muestras con el amortiguador de carga se pusieron en los pozos y la electroforesis se corrió a 60 volts, 30 mA, y 1:30 hrs. Se observó en un transiluminador de UV (BioImagic Systems) y se registró.

5.5 Restricción del producto de la PCR mediante la enzima *RsaI*

La endonucleasa *RsaI* reconoce la secuencia GT₂AC. El gen 5800 presenta tres sitios de corte con esta enzima y se generan cuatro productos de 392 pb, 301 pb, 84 pb y 30 pb (Figura 4).

```

>392 bp, base 416 a base 807
GACCTCACTGCCCTGGTCCATTACGTTGTTGCCCTCGCCGTCCTCGATTGTCGCTCCAC
GCGAGTTCATCACCGTGCGGGTTTGCCGCGAAGTCGAGAAGGTCGATGGCAGACGTCGTC
TCTGCGTCGCGAACACTTCGTGGCAGCCAGCGAATCTAGCAGAGATCATCCCCGAAGCCA
CAAAGGCTGAGAAGTGGGTCCGCGCCATTGTGCATGCCCAGCTCTTTGTC TTCGAGGAGA
CAGCGCCCCGGGAGTGGCAAGACTAAGGCGACGTTTCATGGTCCATACGGATCCGTGTGGGA
ATGTCCCTGCAATGATTGCCAACAAAGGTCATCATCCATCAGGCCTCAACGCTTACCAGCA
TCAAGACGACTCTAGAGAAGCTCCTTAAGTAG

>301 bp, base 1 a base 301
ATGCTTTCTTTAAATAAAATGCCGCTTTTCAAGGGCACCATTCGCGCAGGACAGCTGGGGCC
GATATCAGGAGCGTGGGTTCCAAGGGCCTTGAGCATGCGCTGAAGCTCCTCACACATCG
TCCTGGGGCGACCCAAAGGTCGAGGAGGGGCTTACGACGACGACTACCAAGGTCGAGGGC
AGCAAGATGGTGGCTCTCAAGGCCGAGCTCGAGATTCCC TACCCATCCAGAGCTGCATC
GCGTGCCCTACGGGAACATCGATGTCGATGAGAGTTACCGGCCGAGGCTCGTGAGAA
T

>84 bp, base 302 a base 385
CCGTTTCGCAAGGCACACTGGTCTCGAAGGAGGATGAGGCTCACTCCAGAAGATCC
ACGACTACATCGACCCAAAGACGT

>30 bp, base 386 a base 415
GACAGCGTTGAAGGCGGCGAGCCGAAGT

```

Figura 4. Secuencia del gen 5800. Los sitios de corte con la endonucleasa *RsaI* están marcados en color rojo.

La identidad del gen se comprobó por medio del patrón de restricción producido por esta endonucleasa. En un tubo Eppendorf la mezcla de reacción contenía 9 µL de agua estéril, 2 µL de 10X Buffer Tango, 2 U de *RsaI* (10 u/µL Thermo Scientific) y 9 µL de los productos de PCR. El tubo se incubó a 37°C/2 hrs. y posteriormente se le puso el amortiguador de carga y se corrió en un gel de agarosa al 2 % a 60 volts, 30 mA y 1:30 hrs. Se observó en un transiluminador UV y se registró.

5.6 Restricción del producto de la PCR mediante la enzima *Bgl*

También se utilizó la endonucleasa *Bgl* para corroborar la identidad del gen amplificado. Esta enzima reconoce la secuencia GCCNNNN₁NGGC. El gen 5800 presenta un sitio de corte, con dos productos de 598 pb y 209 pb (Figura 5).

```
>598 bp, base 1 a 598
ATGCTTTCTT TAAATAAAAT GCCGCTTTTC AAGGGCACCA TTCCGCAGGA
CAGCTGGGCC GATATCAGGA GCGTGGGTTT CAAGGGCCTT GAGCATGCCG
TGAAGCTCCT CACCACATEG TCCTGGGGCG ACCCAAAGGT CGAGGAGGGG
CTTACGACGA CGACTACCAA GGTCGAGGGC AGCAAGATGG TGGCTCTCAA
GGCCGAGCTC GAGATTCCCT ACCCATCCA GAGCTGCATC GCGTGCCCTT
ACGGGAACAT CGATGTCGAT GAGAGTTCAC CGGCCGAGGC TCGTGAGAAG
TACCCGTTTC GCAAGGCACA CTGGTCCCTG AAGGAGGATG AGGCTCACTC
CCAGAAGATC CACGACTACA TCGACCCAAA GACGTACGAC AGCGTTGAAG
GCGGCGAGCC GAAGTACGAC CTCACTGCCC TGGTCCATTA CGTTGTTGCC
TCGCCGTCTT CGATTGTCGC TCCACGCGAG TTCATCACCG TCGGGGTTTG
CCGCGAAGTC GAGAAGGTCG ATGGCAGACG TCGTCTCTGC GTCGCGAACA
CTTCGTGGCA GCCAGCGAAT CTAGCAGAGA TCATCCCCGA AGCAGAA

>209 pb, base 599 a 807
AGCAGAATGAGAA GTGGGTCCGC GCCATTGTGC ATGCCAGCT CTTTGTCTTC
GAGGAGACAG CGCCCGGGAG TGGCAAGACT AAGGCGACGT TCATGGTCCA
TACGGATCCG TGTGGGAATG TCCCTGCAAT GATTGCCAAC AAGGTCATCA
TCCATCAGGC CTCAACGCTT ACCAGCATCA AGACGACTCT AGAGAAGCTC
CTTAAGTAG
```

Figura 5. Secuencia del gen 5800. Los sitios de corte con la endonucleasa *Bgl* están marcados en color rojo.

La mezcla de reacción contenía 9 μ L de agua estéril, 2 μ L de 10X Buffer O, 5 U de *Bgl* (10 u/ μ L Thermo Scientific) y 9 μ L de los productos de PCR. Los tubos se incubaron a 37°C/2 hrs. Posteriormente a cada muestra se le agregó el amortiguador de carga; se preparó el gel de agarosa al 2% en amortiguador TBE 1X y 1 μ L (10 mg/ μ L) de bromuro de etidio, las muestras se colocaron en los

pozos y la electroforesis se corrió a 60 volts, 30 mA y 1:30 hrs. Se observó en un transiluminador UV y se registró.

5.7 Clonación del amplicón de 807 pb en el vector pET 151/D-TOPO

El amplicón que se obtuvo se clonó en un kit de expresión pET direccional TOPO siguiendo las instrucciones propuestas por los proveedores (Invitrogen, 2006). Se utilizó el vector pET 151/D TOPO (Figura 6).

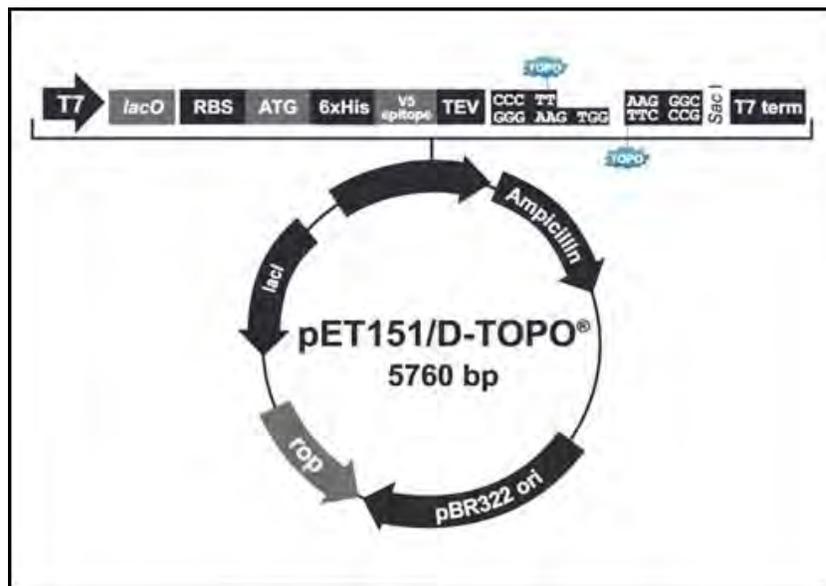


Figura 6. Mapa del vector pET 151/D-TOPO utilizado para la clonación y expresión del gen 5800.

Para la clonación se hizo una mezcla con 3 μ L del producto amplificado de la PCR de la muestra 2 del DNA de *Giardia*, 1 μ L de solución de sal (NaCl y MgCl₂), 1 μ L de agua estéril y 1 del vector TOPO. La mezcla se homogeneizó suavemente y se incubó 5 min./temperatura ambiente. La reacción se almacenó a 4°C hasta la transformación.

5.7.1 Transformación en *E. coli* One Shot TOP 10

Para la obtención de células competentes se utilizó el método del cloruro de calcio sobre células de *Escherichia coli* TOP 10.

Para la transformación se utilizaron las células competentes con la reacción de clonación, la muestra se colocó en un baño de hielo/30 min. Posteriormente se dio un choque térmico a 42°C/30 seg. e inmediatamente se colocó a 4°C/20 min. Después, se le agregaron 250 µL de medio S.O.C. (Caldo superóptimo con represión por catabolito) y se incubó a 37°C/1 hr. Se centrifugó, se sembró en agar Luria (LB) con ampicilina (50 mg/L) y se incubó a 37°C/toda la noche.

5.7.2 Extracción de DNA plasmídico para transformación en BL21

Para obtener el plásmido se utilizó el método de lisis alcalina, el plásmido se usó para transformar la *E. coli* BL21.

Una colonia de bacterias se creció en 10 mL de medio Luria caldo (LB) con ampicilina (50 mg/L) y se incubó a 37°C/toda la noche. Posteriormente toda la muestra se centrifugó a 3500 rpm/15 min., el precipitado se cosechó y lavó con PBS. El precipitado se resuspendió en 225 µL de amortiguador de glucosa (anexo) y se añadió 75 µL de lisozima (8 mg/mL). La muestra se incubó 5 min./temperatura ambiente; después se le añadieron 600 µL de una solución de 0.2 M de NaOH + 1% de SDS y se incubó en un baño de hielo/5 min.

A la muestra se le agregaron 450 µL de acetato de potasio 3M, se homogenizó, se centrifugó a 12000 rpm/12 min./4°C, el sobrenadante se recuperó

y se le añadió 750 μL de isopropanol, se mezcló y se incubó a $-20^{\circ}\text{C}/15$ min. Posteriormente se centrifugó 12000 rpm/12 min./ 4°C , el sobrenadante se descartó, el precipitado se resuspendió con 400 μL de TE y se le agregó 40 μL de acetato de sodio 3 M. Para eliminar el RNA, a la muestra se le agregó 10 μL de RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó a 60 rpm/ $37^{\circ}\text{C}/30$ min. Se llevó a cabo una extracción con fenol/cloroformo, el sobrenadante se resuspendió en 30 μL de TE y se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% (anexo). La electroforesis se corrió a 60 volts, 30 mA y 1:30 hrs. Se observó en un transiluminador UV y se registró.

5.7.3 Identificación de clones recombinantes pET151-5800 por PCR del gen 5800

Para asegurar que el plásmido tuviera el gen insertado, se realizó una PCR, utilizando el DNA plasmídico obtenido bajo las mismas condiciones de amplificación para el gen de 807 pb. Se visualizó en un gel de agarosa al 1.5%. Se observó en un transiluminador UV y se registró.

5.8 Transformación en BL21 Start (DE3)

Para la transformación de la BL21 Start (DE3) se siguió la información contenida en el manual (Invitrogen, 2006). Brevemente: 10 ng del DNA plasmídico y un vial con BL21 Start (D3) se mezclaron, se incubaron en hielo/30 min., y se dio un choque térmico a $42^{\circ}\text{C}/30$ seg. la muestra posteriormente, se transfirió a un

recipiente que contenía hielo, se le añadió 250 μ L de medio S.O.C y se incubó a 37°C/30 min. La mezcla se colocó en medio LB sólido, con ampicilina y se incubó a 37°C/ toda la noche.

5.8.1 Preparación de muestras BL21

Una colonia de BL21 Start se incubó en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina a 37°C/toda la noche. Posteriormente, una alícuota de 500 μ l del cultivo se colocó en 10 mL de medio LB líquido con ampicilina y se incubó a 37°C/2 hrs. La muestra se dividió en dos lotes:

El primero se cosechó y se eliminó el sobrenadante. El pellet se almacenó a -20 °C hasta su uso. Esta muestra corresponde al lote no inducido.

El segundo se indujo añadiendo IPTG a 1 mM, se incubó a 30°C/24 hrs. Después se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en solución de lisis (anexo), la mezcla fue lisada con ciclos de congelación/descongelación. Se centrifugó a 12000 rpm/4°C/10min. a 4°C para las proteínas insolubles y el sobrenadante se transfirió a otro tubo para las proteínas solubles. Se mezcló cantidades equivalentes de sobrenadante (proteínas solubles) y 2X SDS-PAGE (anexo), y 500 μ L de 1X SDS-PAGE con el precipitado (proteínas insolubles), ambas muestras se hirvieron durante 5 min.

Para el lote no inducido se mezcló en 80 μ L de 1X SDS-PAGE, se hirvió durante 5 min.

5.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras (20 μ L) se corrieron en un gel de acrilamida al 12% a 280 V, 30 mA, 10 W y 1:30 hrs. Para visualizar las proteínas, se llevó a cabo una tinción de plata siguiendo las instrucciones de los proveedores (Bio-Rad, s.a). Brevemente: El gel se colocó en un recipiente donde se fijó con 40% metanol/10% ácido acético, 30 min. Se aplicó dos veces 10% etanol/5% ácido acético, 15 min. Se puso el reactivo oxidante (anexo) 5 min. y se lavó el gel con agua desionizada. Se añadió el reactivo de plata (anexo) 20 min. y se lavó de nuevo el gel con agua desionizada, se adicionó el reactivo revelador (anexo) hasta que apareció un precipitado marrón y la reacción se paró con 5% de ácido acético. Todos los reactivos añadidos fueron de 50 mL.

El gel se lavó con 50 mL de agua desionizada, se agregó 2 mL de glicerol, se dejó durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Fue colocado en celofán y se secó en un secador de geles (BioRad Model 543 Gel Dryer) por 1 hora.

5.9 Purificación de la proteína de 29 kDa por cromatografía de afinidad a Ni-NTA

Para la purificación de la proteína se utilizó el protocolo de Ni-NTA bajo condiciones nativas (Thermo Fisher manual, s.a).

Las bacterias transformantes BL21 en 50 mL de medio Luria se incubaron a 37°C/toda la noche, el cultivo se transfirió a 500 mL de medio LB con ampicilina, y se incubó a 37°C/2 hrs. con agitación y se indujo añadiendo IPTG 1mM. Se incubó a 30°C/toda la noche. Las células se cosecharon, se lavaron con PBS y el precipitado se resuspendió en 8 mL de amortiguador nativo de unión (anexo), se añadió 8 mg de lisozima y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM. La solución se colocó en hielo y se dio sonicación (Branson 250) con una micropunta y control de ajuste de 3, se dieron 7 ciclos de 15 segundos con 45 segundos de descanso entre cada uno; posteriormente se centrifugó a 3500 rpm/4°C/ 10 min., y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

El lisado que se obtuvo se colocó en la columna de Ni-NTA previamente preparada (anexo), y se mantuvo a 4°C/1 hr., se aspiró el sobrenadante y se tomó una alícuota de 500 µL que fue almacenada a -20°C, se lavó con 8 mL de amortiguador nativo de lavado (anexo), se resuspendió por inversión y se aspiró el sobrenadante. A la columna se le añadió 8 mL del amortiguador nativo de elución, se resuspendió y todo el sobrenadante fue colectado; posteriormente se centrifugó a 5000 rpm/4°C/30 min. en una unidad Amicon en un tubo de centrifuga, para concentrar a la proteína.

La cuantificación de la muestra purificada se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO) a una longitud de onda de 280 nm. Tomando en cuenta un coeficiente de extinción de 1.

Para liberar la cola de histidina se utilizó el Kit TEV proteasa (Invitrogen, 2013). Brevemente: En un tubo de microcentrífuga se colocó 20 µg de la proteína purificada, 7.5 µl de 20 x TEV amortiguador, 1.5 µl 0.1 M DTT, 1 µl AcTEV Proteasa y el resto de agua para un volumen final de 150 µl. La mezcla se incubó a 4°C/2 ors. Se colocaron 15 µg de cada muestra en un gel de acrilamida al 12% y se tiñó con Coomasie blue.

5.10 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la proteína recombinante

Se siguió un protocolo de inmunización de tres (15, 15, 10).

Dos ratones hembras de la cepa BALB/c se inmunizaron por vía intraperitoneal con 30 µg de la proteína purificada en adyuvante completo de Freund en un protocolo 1:1. A los 15 días fue con 1:3 y finalmente solo con el antígeno, 10 µg en 50 µl de adyuvante. Se obtuvo sangre de la vena caudal para obtener el suero.

Para obtener antígenos totales de *G. intestinalis*, los trofozoítos del aislado HGINV en fase log se cosecharon y lavaron con PBS pH 7.2. Se les agregó una mezcla de EDTA, ácido aminocaproico y DTT que se ajustaron a una concentración final de 1mM. Se lisaron mediante ciclos de congelación/descongelación, se determinó la concentración de antígenos totales a 280 nm, y la muestra se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.10.1 Inmunodetección del antígeno

Se disolvieron en solución amortiguadora de carbonatos, 15 µg/mL de antígenos totales de *Giardia*, 15 µg/mL de proteína purificada y PBS (control negativo).

Los pozos de la placa de poliestireno (Corning, 35090) se sensibilizaron con 100 µL del antígeno de *Giardia* (15 µg/mL), la proteína recombinante y PBS. La placa se incubó 4°C/ toda la noche.

Posteriormente, se hicieron tres lavados con 200 µL de solución de lavado (PBS-Tween-20 al 0.5%), se bloqueó con 200 µL/pozo con solución de bloqueo (leche descremada al 5 %) (Anexo) a 37°C/30 min. Después, se colocaron 100 µL del suero de ratón diluido 1:500 en solución de lavado, se incubó a 37°C/30 min. Se lavó tres veces. Se adicionó el conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución 1:500, se incubó a 37°C/30 min. y se lavó tres veces.

Se agregaron 100 µL de solución de cromógeno (5 mL de citrato de sodio 0.1M, 5 mL ácido cítrico 0.1 M, 4 mg de ortofenildiamina y 4 µL de H₂O₂ al 30%). Se incubó 15 min. /temperatura ambiente, en la oscuridad. La reacción se detuvo con 100 µL/pozo H₂SO₄ 2N (anexo). La absorbancias se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm.

6. RESULTADOS

6.1 Cuantificación y pureza de DNA

El DNA se obtuvo de dos lotes del aislado HGINV. En el primer lote se obtuvieron 12.8 µg y en el segundo lote fue 33.9 µg. La pureza se obtuvo de la diferencia entre la absorbancia a 260/280 y la óptima está entre 1.7 y 2. La muestra 2 presentó mayor concentración (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración y pureza del DNA de *Giardia intestinalis*

Aislado HGINV	Concentración (ng/µL)	Pureza 260/280
Muestra 1	427.2	1.73
Muestra 2	1131.2	1.79

6.2 Integridad del DNA

La integridad del DNA de las dos muestras se observa en la Figura 7. En ambas solamente se observa una banda mayor de 20 Kb. La del carril 2 intensamente marcada.

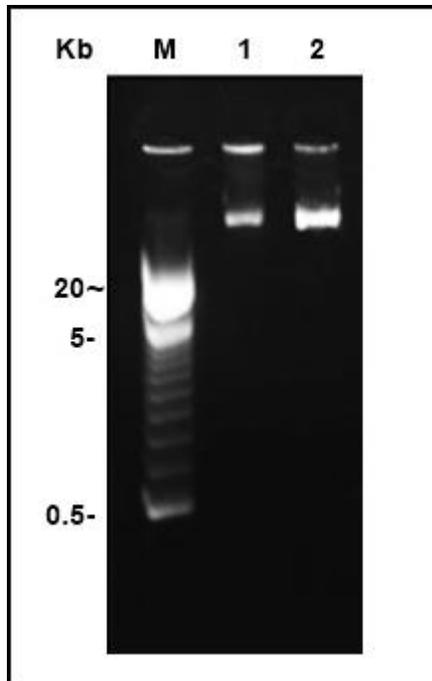


Figura 7. Gel de agarosa al 1% con las dos muestras de *Giardia*. Kb: Kilobases. M: marcador de pares de bases (1 Kb); Carril 1: DNA de la muestra 1. Carril 2: DNA de la muestra 2.

6.3 Amplificación del gen 5800 de *Giardia* mediante PCR

El gen 5800 codifica a una proteína hipotética con dominio start de unión a lípidos de 807 pares de bases. La electroforesis muestra un amplicón de ~807 pares de bases en las dos muestras obtenidas del aislado HGINV y la de una cepa de referencia de *Giardia* (WB) (Figura 8).

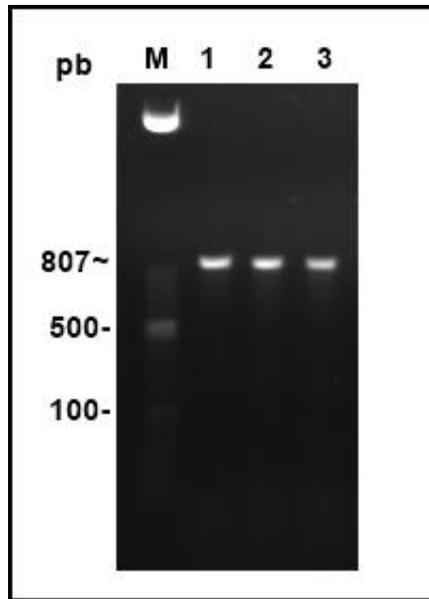


Figura 8. Gel de agarosa al 1% con los amplicones de ~807 pares. pb: pares de bases; M: marcador de pares de bases (escalera de 100 pb); Carril 1: muestra 1; Carril 2: muestra 2. Carril 3: cepa de referencia WB.

6.4 Productos de la restricción del gen 5800 con la endonucleasa *RsaI*

La Figura 4 muestra los sitios de cortes en el gen 5800 de *Giardia* que generan productos de ~392, ~301, ~84 pb y ~30 pb. La restricción de los amplicones del gen 5800 con la endonucleasa *RsaI* generó los productos esperados a los obtenidos *in silico* (Figura 9).

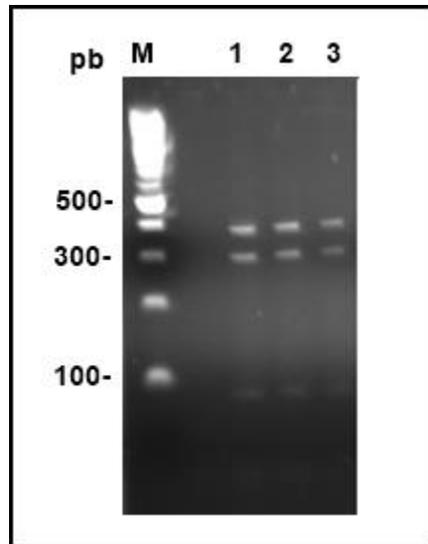


Figura 9. Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de la restricción del gen 5800 con la endonucleasa *RsaI*. Pb: pares de bases; M: Marcador de pares de bases (escalera 100pb); Carriles 1 y 2: muestras 1 y 2 del DNA del aislado de *Giardia* HGINV. Carril 3: aislado WB. En todos los casos se observan bandas de ~392, ~301, ~84 pb y ~30 pb.

6.5 Productos de la restricción del gen 5800 con la endonucleasa *BglI*

La Figura 5 muestra el resultado *in silico* del sitio de corte del gen 5800 de *Giardia* con la enzima *BglI*. La identidad de los amplicones del gen 5800 también se comprobó mediante el patrón de restricción con *BglI*. En las tres muestras que se restringieron con esta enzima generaron los productos esperados de ~598 y ~209 pb (Figura 10).

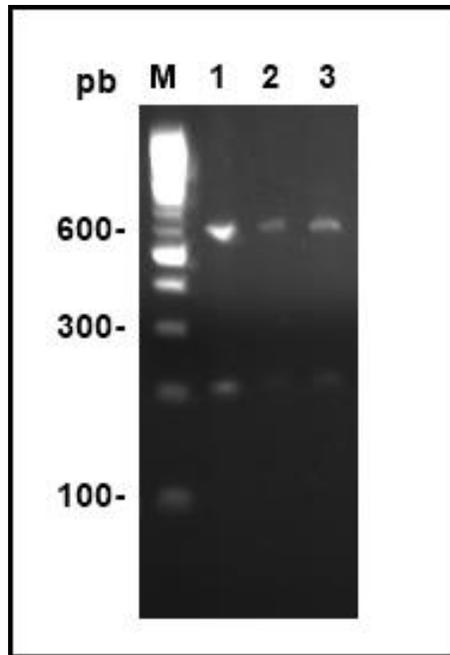


Figura 10. Gel de agarosa al 2%, muestra los productos de la restricción del gen 5800 con la endonucleasa *BglI*. Pb: pares de bases; M: Marcador de pares de bases (escala 100pb); Carriles 1 y 2: muestras 1 y 2 del DNA del aislado de *Giardia* HGINV. Carril 3: cepa referencia WB. En todos los casos se observan bandas de ~598 y ~209 pb.

6.6 Colonias de *E. coli* One Shot TOP 10 con el plásmido

La formación de colonias de *E. coli* Shot TOP 10 transformadas en medio de cultivo en agar que tiene ampicilina, garantiza que son células transformadas, porque presentan el gen de resistencia a este antibiótico. En la Figura 11 se muestran las colonias bacterianas.

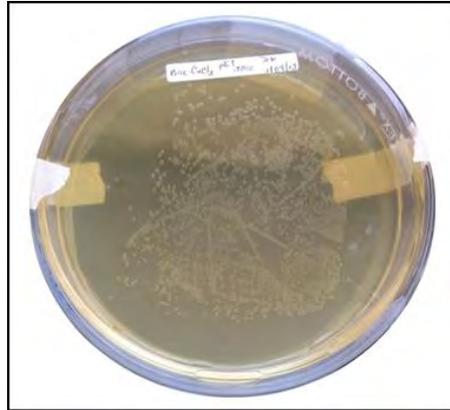


Figura 11. Caja e Petri con colonias transformantes de *E. coli* One Shot TOP10, medio sólido LB con ampicilina.

6.6.1 DNA del plásmido

La electroforesis del gel de agarosa muestra un producto > 5 Kb que corresponde al DNA del plásmido, extraído mediante lisis alcalina (Figura 12).

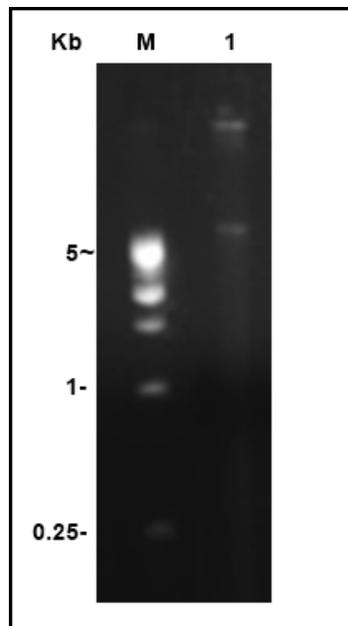


Figura 12. Gel de agarosa al 1.5 % con una muestra de DNA del plásmido. Kb: Kilobases. M: marcador de peso molecular (1 Kb). Carril 1: DNA plásmido

6.6.2 PCR del DNA obtenido del pET151-5800

Para corroborar que el inserto de ~807 pb se encontraba en el plásmido, se obtuvo el DNA y se amplificó el producto mediante PCR. En la Figura 13 se observa un producto de ~807 pb a partir de una muestra 2 de DNA de trofozoítos de *Giardia* y a partir del DNA del plásmido con el inserto.

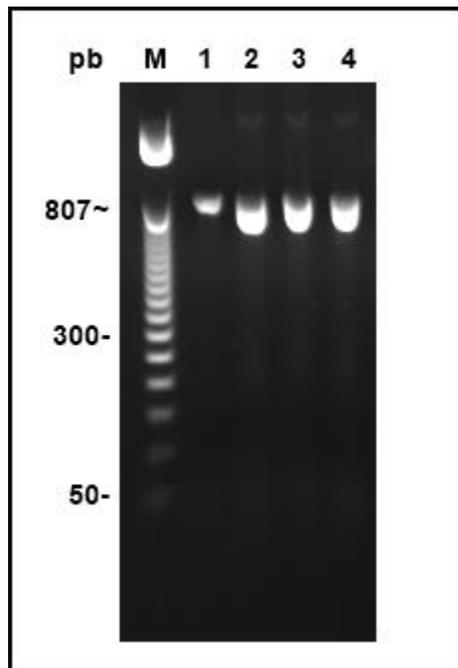


Figura 13. Gel de agarosa con los productos amplificados a partir del DNA del plásmido con el inserto de 807 pb. pb: pares de bases; M: Marcador de pares de bases (escalera 50 pb);. Carril 1: DNA del aislado HGINV de *G. intestinalis*. Carril 2, 3 y 4: DNA del plásmido con el inserto.

6.7 Colonias de bacterias BL21 Start (D3) de expresión

Después de que se corroboró que el plásmido sí tenía el inserto, se procedió a la inserción del DNA en las bacterias BL21 Start (D3) de expresión. La formación de colonias en medio de cultivo en agar con ampicilina se observa en la Figura 14.

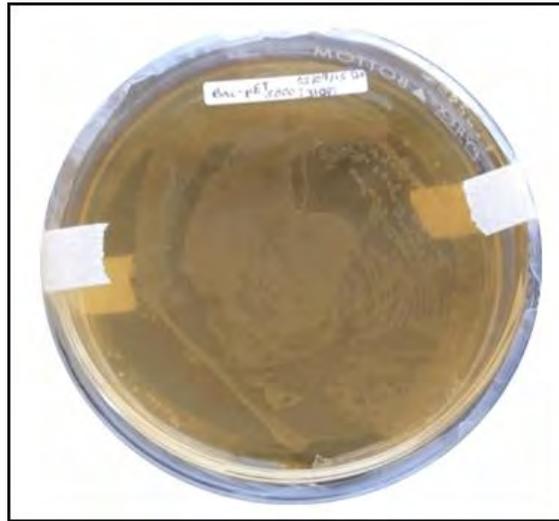


Figura 14. Caja de Petri con colonias de bacterias BL21 Start (D3) cultivadas en medio sólido LB con ampicilina.

6.7.1 SDS-PAGE para las proteínas expresadas en BL21

La proteína 5800 tiene un peso aproximado de 29 kDa. Para la electroforesis en gel de acrilamida, se pusieron en cada pozo 15 μ g de proteína de bacterias no inducidas y de proteínas solubles e insolubles de bacterias inducidas. Para visualizar las bandas se utilizó la tinción de plata; como se puede observar en la Figura 15 se aprecia una banda intensamente teñida de 29 kDa en el carril 3 que

contiene la proteína soluble, menos marcada en el carril 2 y muy difuminada en el carril 1.

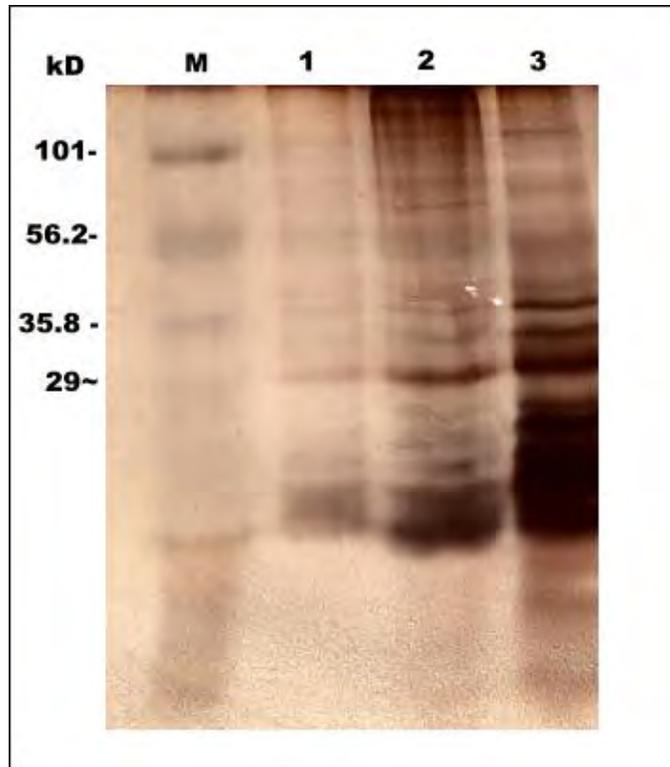


Fig. 15 Gel de acrilamida al 12% con proteínas expresadas en BL21. M: Marcador de peso molecular (Broad range pretaied SDS-PAGE standard). Carril 1: Control – (Proteína de bacterias no inducidas). Carriles 2 y 3 Proteínas insolubles y solubles de células transformadas, respectivamente.

6.8 Detección de proteína purificada en gel de acrilamida

La proteína recombinante de 29 kDa se purificó mediante una columna Ni-NTA, la concentración total de la proteína purificada fue de 843 µg. Se pusieron 15 µg de proteína en cada pozo de un gel de acrilamida al 12 %. Como se puede observar en la Figura 16 la proteína con cola de histidina (carril 1), y las proteínas sin cola de histidina (carriles 3 y 4) tienen un peso de 29 kDa.

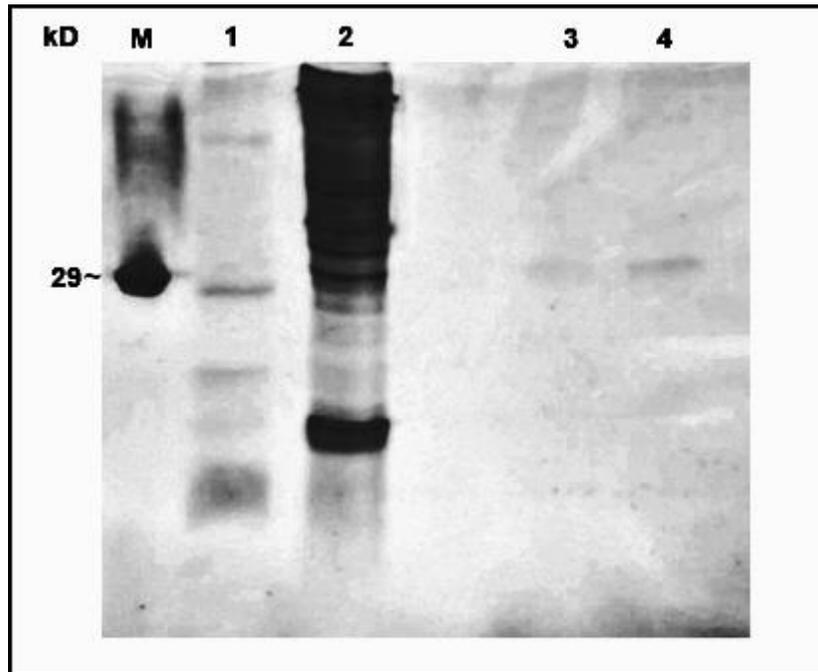


Figura 16. Gel de acrilamida con las proteínas recombinantes purificadas y teñido con azul de Coomassie. M: Marcador molecular (Anhidrasa carbónica, 29 kDa Sigma): Carril 1: Proteínas purificadas con cola de histidina. Carril 2: proteínas totales. Carriles 3 y 4: Proteína purificada sin segmento histidina.

6.9 Inmunodetección de la proteína recombinante en antígenos de *Giardia intestinalis* del aislado HGINV

El resultado que se obtuvo del ELISA al sensibilizar la placa con la proteína recombinante y las proteínas de trofozoítos de *Giardia* se muestra en la Tabla 4. Para la reacción antígeno anticuerpo se utilizó el suero del ratón inmunizado con la proteína recombinante. Como se puede observar ambas estuvieron por arriba del valor de corte.

Tabla 4. Absorbancia obtenida de ELISA

	Control – (PBS)	Proteína purificada	Proteínas totales de <i>Giardia</i>
Absorbancia	0.0778	1.05793333	0.1201

Valor de Corte = 0.1145 (Promedio del control negativo \pm tres veces su desviación estándar).

La Figura 17 muestra los pozos de la placa de ELISA sensibilizada con: A) proteínas totales de *Giardia*, B) la recombinante purificada. Como se documentó en la Tabla 4, en las proteínas de *Giardia* hubo una menor absorbancia en comparación con la proteína recombinante.

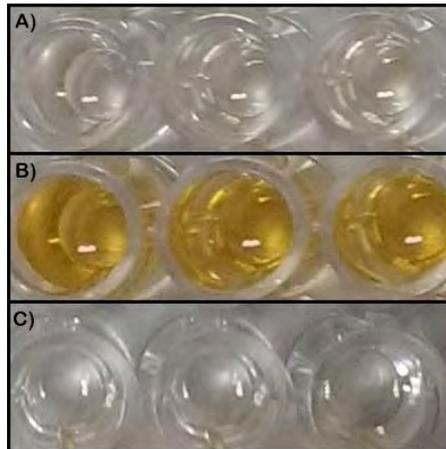


Figura 17. Placa de ELISA. A) Proteínas totales de trofozoítos de *Giardia*, B) Proteína recombinante purificada, C) Control negativo (PBS).

7. DISCUSIÓN

En el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con un aislado de *Giardia intestinalis* con capacidad de invadir el epitelio intestinal (Martínez-Gordillo *et al.*, 2014). Consideramos que es fundamental estudiar las diferencias bioquímicas o moleculares del aislado invasor de otros aislados no invasores. Por esta razón en este trabajo, el objetivo fue obtener una proteína recombinante a partir del gen 5800, para que en un futuro se pueda utilizar para el estudio de la interacción hospedero-parásito.

Es importante mencionar que esta proteína 5800 pertenece a un dominio START (proteína reguladora esteroidogénica) y que estos dominios son capaces de unirse a lípidos, se sabe que transfieren lípidos entre membrana y están relacionados con el metabolismo de lípidos y señalización celular (Potting, 1999; Stocco, 2001).

Durante este proyecto, se purificó el DNA de los trofozoítos de *G. intestinalis* del aislado HGINV y se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación del gen 5800 (Figura 7 y Figura 8). Se hizo un análisis *in silico* para determinar el número de productos que se obtendrían a partir de la restricción con dos endonucleasas (*Rsal* y *BglII*) y de esta manera asegurar que el gen amplificado (~807 pb) era el esperado. Efectivamente, se pudo observar que el patrón de restricción correspondió al obtenido *in silico* (Figura 9 y Figura 10).

El amplicón (~807 pb) del gen 5800 se introdujo en el vector pET151/D-TOPO y se reprodujo en *E. coli* OneShot TOP10. Pero, para comprobar que las

transformantes y el inserto fuera correcto, se podía seguir dos estrategias: en la primera, utilizar los patrones de restricción del gen insertado y la segunda mediante la extracción del DNA plasmidico que ya se encontraba en la *E. coli* OneShot TOP10, y posteriormente realizar una PCR con los primers del gen 5800. Se optó por la segunda estrategia, porque la técnica es más simple (Figura 11) y los resultados mostraron que el inserto estaba en el plásmido (Figura 13).

Después se obtuvieron bacterias (*E. coli* cepa BL21) que expresaran el gen, en este caso los cultivos fueron inducidos con 1 mM de IPTG. En todos los casos se puso la misma concentración de proteína y en el corrimiento electroforético de las proteínas de las bacterias de expresión se pudo observar a la proteína (29 kDa) en mayor concentración en el extracto de proteínas solubles que en las proteínas insolubles (Figura 15). También se observó una banda (muy tenue) con el mismo peso molecular en las bacterias no inducidas.

Se utilizó un sistema por medio de un pET que regula la expresión de un gen recombinante bajo el promotor de la polimerasa T7 y el operador *lac*. Studier (2005) reportó la autoinducción de proteínas, en un cultivo de densidad alta, por medio de lactosa ya presente en el medio o químicamente definidos al comienzo del cultivo, cuando los metabolitos como la glucosa se agotan durante el crecimiento; provoca que la lactosa cause la inducción del operón *lac*, sin la necesidad de añadir un inductor (IPTG).

Xu *et al.* (2012) reportan que la lactosa y la galactosa también inducen la producción de proteínas en *E. coli* BL21 con operón *lac*. Además, su estudio mostró que el IPTG suprimió el crecimiento celular, mientras que la inducción con

galactosa, permitió que los cultivos de *E. coli* tuvieran una densidad considerablemente mayor, similar a los cultivos no inducidos.

Debido a que la electroforesis de las proteínas recombinantes mostraba una gran cantidad de bandas decidimos purificar la que nos interesaba. Por tal motivo, se purificó en una cromatografía de afinidad Ni-NTA y el segmento de histidina fue removido. En la Figura 16 el carril 1, donde está la proteína recombinante con la cola de histidina se observa una proteína de 29 kDa y otras proteínas de aproximadamente ~14 y ~40 kDa. Bolanos-Garcia y Richard (2006) reportan proteínas nativas de *E. coli* que son co-purificadas junto la proteína de interés, cuando se realiza cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC); reconoce tres mecanismos a la unión de la resina; un sitio de unión de metales que puede unirse (níquel o cobalto), la presencia de residuos de histidina que se unen al metal y durante la purificación se involucra glutatión sefarosa, aumentando la posibilidad de que se una a sefarosa (componente de la resina) por medio de interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto de unión.

Los dos contaminantes más comunes en *E. coli* son *ArnA* y *SlyD*, que se co-purifican en cantidades casi iguales, en comparación con la proteína objetivo. Por lo cual, se infiere que las proteínas observadas en la Figura 16, corresponden a contaminantes propios de *E. coli*. Para aumentar la pureza de la proteína se recomienda utilizar pasos de purificación múltiples, reduciendo el rendimiento y aumentando el tiempo y costo de purificación (Andersen *et al.*, 2013). La proteína recombinante sin cola de histidina dio un patrón de 29 kDa.

Ya obtenida la proteína recombinante, era necesario producir anticuerpos policlonales de esta proteína; el anticuerpo reconoció a las proteínas de trofozoítos de *Giardia* invasora (Tabla 4 y Figura 15).

Como se describió anteriormente la importancia de esta proteína 5800 es que se une a lípidos, por lo que se considera, indispensable para *Giardia* dado que el parásito no sintetiza lípidos de *novo* y los adquiere del intestino delgado de su hospedero. Yichoy *et al.* (2009) demostraron que los trofozoítos pueden internalizar los lípidos directamente del medio de cultivo y transportarlos a diferentes lugares, tales como: membranas plasmática y nuclear; citoplasma y retículo endoplasmático. Para el movimiento de moléculas de lípidos usa a la actina y microtúbulos; en *Giardia* los microtúbulos constituyen numerosas estructuras del trofozoíto incluyendo el disco ventral, cuerpos basales, flagelos y cuerpos medios (Crossley *et al.*, 1986; Castillo *et al.*, 2009).

En los parásitos protozoos, los fosfolípidos son esenciales para la síntesis de la membrana y organelos; además, desempeñan un papel clave en la producción de energía. En los parásitos intracelulares pueden alterar los componentes de la membrana de sus hospederos e intercambiar restos lipídicos, permitiendo que sobrevivan y se multipliquen (Vial y Ancelin 1991; Yichoy *et al.*, 2009).

Plasmodium falciparum, es un parásito intracelular responsable de millones de casos de malaria, presenta una proteína START (PFA0210c) relaciona con la transferencia de lípidos (Hill *et al.*, 2016). En *Plasmodium* la transferencia de

lípidos, induce cambios radicales dentro de la célula huésped por medio de un sistema de exomebrana (Sherling y van Ooij, 2016).

Finalmente, consideramos que la producción de estas herramientas (proteína recombinante a partir del gen 5800 de *Giardia intestinalis* y la obtención de anticuerpos policlonales) servirán para estudiar la interacción hospedero-parásito.

8. CONCLUSIONES

Se obtuvo la proteína recombinante a partir del gen 5800, lo que nos permitió generar una herramienta molecular, para estudios posteriores de interacción huésped-parásito.

Se evaluó la presencia de la proteína 5800 mediante inmunodetección y se demostró en antígenos de *Giardia* invasora.

9. PERSPECTIVAS

Obtener anticuerpos monoclonales a partir de esta proteína recombinante para el análisis ultraestructural en la interacción hospedero-parásito.

10. ANEXO

Green y Sambrook (2012)

Solución salina de fosfatos (PBS) 10X

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

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 1L. Para PBS 1X se tomaron 100 mL de la solución 10X y se aforó a un 1L con agua desionizada.

Solución de lisis

Reactivos	Concentrada	Necesaria	Poner μ L
Tris pH 7.4	2 M	10 mM	25
EDTA	0.5 M	10 mM	100
NaCl	5 M	50 mM	150
SDS	10 %	0.4%	200
H ₂ O			4525
Proteinasa K	10 mg/mL	200 μ L	20

En este orden se disolvieron los primero cuatro reactivos, se aforó a 5 mL con agua desionizada. La proteinasa K se agregó a los tubos que contenían las células con la solución de lisis.

Acetato de sodio 3M

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

Al acetato de sodio se le agregó 80 mL de agua, se ajustó el pH a 7.0, se aforó a 100 mL y se esterilizó por autoclave.

Proteinasa K

Reactivo	Cantidad
Proteinasa K	10 mg
TE	1 mL

La proteinasa K se disolvió en 1 mL de TE, se hicieron alícuotas de 100 µL y se almacenó a -20°C hasta su uso.

TE (Tris/EDTA)

Reactivo	Cantidad
Tris 10 mM pH 7.4	500 µL del concentrado de 2 M
EDTA 0.1 mM pH 8	20 µL del concentrado de 0.5 M
H ₂ O	99.48 mL

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

RNAsa

Reactivo	Cantidad
RNAasa	10 mg
TE	1 mL

La RNAsa se disolvió en 1 mL de TE, se dividió en 10 partes y se almacenó a -20°C.

TBE 20X (Amortiguador de Tris Boratos con Sal Disódica de Ácido EtilendiaminaTetraacético)

Reactivo	Cantidad
Tris Base 1 M	121 g
Ácido bórico 1 M	61.7 g
EDTA-Na ₂ *2H ₂ O 20 mM	7.44 g
H ₂ O desionizada	1000 mL

Los reactivos se disolvieron en 800 mL de agua desionizada, se aforó a 1 L y se almacenó a temperatura ambiente

Amortiguador de carga

Reactivo	Cantidad
Glicerina	10 mL
Xylenecyanol	25 mg
Azul de bromofenol	100 mg
H ₂ O	10 mL

Se colocó el azul de bromofenol en un matraz, se añadió el agua destilada y la glicerina. Se mezcló y se hicieron alícuotas, se almacenó a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de glucosa

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 25 mM	125 µL del concentrado de 2 M
EDTA 10mM	200 µL del concentrado de 0.5
Glucosa	99 mg

Los reactivos se mezclaron y se aforaron a 10 mL con agua desionizada.

Amortiguador de lisis

Reactivo	Cantidad
KH ₂ PO ₄ 1M	0.3 mL
K ₂ HPO ₄ 1M	4.7 mL
NaCl 400 mM	2.3 g
KCl 100 mM	0.75 g
Glicerol 10 %	10 mL
Tritón X-100 0.5%	0.5 mL
Imidazol 10 mM	68 mg

Los reactivos se mezclaron, se ajustó el pH a 7.8 y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de muestra 2X SDS-PAGE

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 0.5 M, pH6.8	2.5 mL
Glicerol 100%	2 mL
DTT (Ditiotreitol) 10 mM	15.4 mg
Azul de bromofenol	0.02 g
SDS	0.4 g

Se aforó a 10 mL con agua desionizada, se hicieron alícuotas y congeló a - 20°C.

Amortiguador de muestra 1X SDS-PAGE

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 0.5 M, pH6.8	1.25 mL
Glicerol 100%	1 mL
DTT (Ditiotreitol) 10 mM	7.7 mg
Azul de bromofenol	0.01 g
SDS	0.2 g

Se aforó a 10 mL con agua desionizada, se hicieron alícuotas y congeló a - 20°C.

Mezcla para preparar gel de acrilamida

Reactivo	Separador 12 % mL	Concentrador 4 % mL
Agua desionizada	5.03	9
Acrilamida/Bis-acrilamida	6	1.98
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	3.75	-
Tris-HCl 0.5 M, pH6.8	—	3.78
SDS 10%	0.15	0.15
TEMED*	0.0075	0.015
APS 10%*	0.075	0.075

Reactivos se mezclaron al final*

Tris-Base 1.5 M, pH 8.8 (Amortiguador del gel separador)

Reactivo	Cantidad g
Tris-base	18.17

Se disolvió Tris-base en agua desionizada, se ajustó pH con HCl a 8.8, se aforó a 100 mL, se almacenó a 4°C hasta su uso.

Tris-HCl 0.5 M, pH6.8 (Amortiguador de gel concentrador)

Reactivo	Cantidad (g)
Tris-base	16.05

Se disolvió Tris-base en agua desionizada, se ajustó pH con HCl a 6.8, se aforó a 100 mL, se almacenó a 4°C hasta su uso.

Acrilamida 30% / bis-acrilamida 0.8%

Reactivo	Cantidad (g)
Acrilamida	29.2
Bis-acrilamida	0.8

Se mezcló la acrilamida y bis-acrilamida en 100 mL de agua desionizada, se almacenó en un frasco cubierto con papel aluminio a 4°C.

Persulfato de amonio 10 %

Reactivo	Cantidad (g)
Persulfato de amonio (PSA)	0.100

Se disolvió el PSA en 1 mL de agua desionizada.

SDS 10 % (Duodecil sulfato de sodio)

Reactivo	Cantidad (g)
SDS	1

El SDS se disolvió en 10 mL de agua desionizada, se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de electroforesis Tris, glicina y SDS 5X

Reactivo	Cantidad (g)
Tris-base	15
Glicina	72
SDS	5

Se disolvieron los reactivos en 800 mL de agua, se aforó a 1 L. Para preparar la solución a 1X se tomaron 200 mL de amortiguador y se aforó a 1 L. con agua desionizada y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Soluciones para tinción de plata

Reactivo	Cantidad (mL)
Oxidante	5

Los 5 mL de reactivo oxidante se mezclaron con 45 mL de agua desionizada, la solución se preparó al momento.

Reactivo	Cantidad (mL)
Plata	5

Los 5 mL de reactivo oxidante se mezclaron con 45 mL de agua desionizada, la solución se preparó al momento.

Solución reveladora

Reactivo	Cantidad (g)
Revelador	32

Los 32 g del revelador se mezclaron en 1 L de agua desionizada y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

Soluciones para purificación de la proteína

Preparación de la columna Ni-NTA

La preparación de la columna de Ni-NTA se describe a continuación.

- 1.- Se resuspendió en su propia botella la agarosa Ni-NTA, invirtiéndola suavemente.
- 2.- Se pipeteó 1.5 mL de la resina en una columna de purificación, se dejó asentar y el sobrenadante fue desechado.
- 3.- Se añadió 6 mL de agua desionizada y se resuspendió la resina invirtiéndola. Se dejó asentar la resina por gravedad y el sobrenadante fue desechado.
- 4.- Se colocaron 6 mL de Buffer Nativo de Union se resuspendió invirtiéndola, nuevamente se asentó por gravedad y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más.

Amortiguador Nativo de purificación 5X

Reactivo	Cantidad (g)
NaH ₂ PO ₄ 250 mM, pH 8	7
NaCl 2.5 M	29.2

Se mezclaron los reactivos en 180 mL de agua desionizada, se ajustó pH a 8 y se aforó a 200 mL. Se almacenó a temperatura ambiente.

Amortiguador Nativo de unión

Reactivo	Cantidad (mL)
Agua desionizada	80
Buffer Nativo de Purificación	20

Se mezcló y ajustó pH a 8

Amortiguador Nativo de lavado

Reactivo	Cantidad
Buffer Nativo de purificación 1X	50 mL
Imidazol 3 M, pH 6	335 μ L

Se mezcló y ajustó pH a 8

Amortiguador Nativo de Elución

Reactivo	Cantidad (mL)
Buffer Nativo de Purificación 1X	13.75
Imidazol 3 M, pH 6	1.25

Se mezcló y ajustó pH a 8

Amortiguador de carbonatos 0.1M, pH9.6

Reactivos	Cantidad (g)
Na ₂ CO ₃	3.18
NaHCO ₃	5.86

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó el pH a 9.6, se aforó a 1 L y se mantuvo a 4°C.

Solución de lavado (PBS Tween-20 al 0.05%)

Reactivo	Cantidad (mL)
Tween 20	0.5
PBS pH 7.2	1000

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de agua desionizada, se aforó a 1L y se almacenó a 4°C.

Solución de bloqueo

Reactivos	Cantidad
Leche descremada	0.5 g
PBS Tween-20 0.05%	10 mL

Los reactivos se prepararon al momento.

Solución para parar la reacción

Reactivo	Cantidad (mL)
H ₂ SO ₄	55.17

El H₂SO₂ 2N se puso en 800 mL de agua desionizada y se aforó a 1L. Se almaceno a 4°C hasta su uso.

11. REFERENCIAS

- Adam, R. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), pp. 447-475.
- Adam, R., Dahlstrom, E., Martens, C., Bruno, D., Barbian, K., Ricklefs, S., Hernandez, M., Narla, N., Patel, R., Porcella, S. y Nash, T. (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of type A1 and E (WB and Pig). *Genome Biology and Evolution*. 5(1), pp. 2498-2511.
- Andersen, K., Leksa, N. y Schwartz, T. (2013). Optimized *E. coli* expression strains LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins: Structure, Functions, and Bioinformatics*, 81(11), pp. 1857-1861.
- Andesell, B., McCoville, M., Ma'ayed, S., Dagley, M., Gassery, R., Suård, S. y Jex, A. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp. 888-901.
- Bazán-Tejeda, M., Argüello-García, R., Fonseca-Liñan, R., Svård, S. y Ortega-Pierres, G. (2010). Adhesion of *Giardia* to epithelial cells: structures, molecules and pathogenicity. *Parasitology Research Trends*, Chapter 2.
- Bio-Rad, (s.a). Silver Stain. Manual de instrucciones. No. LIT34. USA. pp. 1-11.
- Bolanos-Garcia, V. y Davies, O. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilized metal

- affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1760(9), pp. 1304-1313.
- Brandborg, L., Tankersley, C., Gottlieb, S., Barancik, M. y Sartor, V. (1967). Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology*. 52(1), pp. 143-150.
- Buret, A. (2007). Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*, 56(3), pp.316-317.
- Cacció, S. (2004). New methods for the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Parasitology*, 46(1-2), pp. 151-155.
- Cacció, S. y Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), pp. 75-80.
- Caccio, S. y Sprong, H. (2011). Epidemiology of giardiasis in humans. In: *Giardia a model organism*. Lujan, H. y Svärd, S. pp 17-28.
- Cantey, P., Roy, S., Lee, B., Cronquist, A., Smith, K., Liang, J. y Beach, M. (2011). Study of nonoutbreak giardiasis: novel findings and implications for research. *The American Journal of Medicine*, 124(12), pp. 1175.e1-1175.e8.
- Castillo, C., Hernandez, Y., Roychowdhury, S. y Das, S. (2009). Cytoskeleton-based lipid transport in a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. In: *Giardia and Cryptosporidium: from molecules to disease*. Wallinford, UK.
- Chin, A., Teoth, D., Scott, K., Medding, J., Macnaughton, W. y Buret, A. (2002). Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia*

- disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infection and Immunity*, 70(7), pp. 3673-3680.
- Cox, F. (2002). History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), pp.595-612.
- Crosseley, R. Marshall, J., Clark, J. y Holberton, D. (1986). Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to alpha-tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *Journal of Cells Science*, 80 (1), pp. 233-252.
- De Haro, A. J., Salazar S., P. M. A y Cabrera, B. M. (1995). Protozoos *Giardia lamblia* en *Diagnóstico Morfológico de la Parasitosis*. 2da. ed., México: Méndez Editores, pp. 27-28.
- Donowitz, J., Alam, M., Kabir, M., Ma, J., Nazib, F., Platts-Mills, J., Bartelt, L., Haque, R. y Petri, W. (2016). A Prospective Longitudinal Cohort to Investigate the Effects of Early Life Giardiasis on Growth and All Cause Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, 63(6), pp. 792-797.
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). Annual epidemiological report for 2015. Stockholm.
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T., Hetsko, M., Smith, J., Kagnoff, M. y Gillin, F. (2000). Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against

the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *The Journal of Immunology*, 164(3), pp.1447-1487.

Eckmann, L. y Gillin, F. (2001). Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions I. pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(1), pp.G1-G6.

Erlandsen, L., Sherlock, A., Januschka, M., Schupp, G., Schaefer, W., Jakubowski, W., y Bemrick, J. (1998). Cross-species transmission of *Giardia* spp.: Inoculation of beavers and muskrats with cysts of human beaver mouse and muskrat origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(1), pp.2777-2785.

Erlandsen, L., Weissner, S., y Ottenwaelter, C. (2002). Investigation into the life cycle of *Giardia* using videomicroscopy and field emission SEM. En B.E. Olson, M.E. Olson, y P. M. Wallis (eds), *Giardia*, the Cosmopolitan Parasite. *CABI Publishing*. New York, pp. 3-14.

Farthing, M., Keusch, G. y Carey, M. (1985). Effect of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*: possible implications for pathogenesis of intestinal disease. *Journal of Clinical Investigation*, 76(5), pp.1727-1732.

Farthing, M., Pereira, M. y Keusch, G. (1986). Description and characterization of a surface lectin *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 51(2), pp. 661-667.

- Faust, E. Russell, P. y Jung, R. (1979). *Parasitología clínica*. Capítulo 9. Salvat. México. D.F. pp.60.
- Filice, P. (1952). *Studies on the cytology and life history of Giardia from the laboratory rat*. Berkeley: University of California Press, pp.53-146.
- Fleck, S., Hames, S. y Warhurst, D. (1985). Detection of *Giardia* in human jejunum by the immunoperoxidase method. Specific and non-specific results. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(1), pp. 110-113.
- Gardner, T. y Hill, D. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), pp.114-128.
- Gascón, J. (2001). Profilaxis de la diarrea del viajero. *Gastroenterología y hepatología*. 24(1), pp. 447-449.
- Gómez, J. (2010). Protozoología médica: Protozoos parásitos en el contexto latinoamericano. Cap. 6 *Giardia*. *Manual moderno*, Colombia. p. 108.
- Green, M. y Sambrook, J. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 4 th ed. USA. pp. 1-2100.
- Hegner, W. (1926). *Giardia beckri* n. sp. from the ground squirrel and *Entamoeba diploDOMYSI* n.sp. from the kangaroo rat. *The Journal of Parasitology*, 12(4), pp. 203-206.
- Hill, D. (1993). Giardiasis issues in diagnosis and management. *Infectious Diseases Clinics of North America*, 7(3), pp. 503-525.

Hill, D. y Nash, T. (2011). Intestinal flagellate and ciliate infections. In: Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice, 3rd ed, Guerrant RL, Walker DA, Weller PF (Eds), Saunders Elsevier, Philadelphia 2011 pp.623.

Hill, R., Ringel, A., Knuepfer, E., Moon, R., Blackman, M. y van Ooji, C. (2016), Regulation and essentiality of the StAR-related lipid transfer (START) domain-containing phospholipid transfer protein PFA0210c in malaria parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 291(46), pp. 24280- 24292.

Invitrogen, (2006). Champion pET directional TOPO expression kits. User Manual.

Invitrogen, (2006). AcTEV Protease. User Manual.

Karapetyan, A. (1962). *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. *The Journal of Parasitology*, 48(3), pp. 337-340.

Lane, S. y Lloyd, D. (2002). Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(2), pp. 125-147.

Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. y Sogin, M. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40(9), pp. 1063-1074.

Leitsch, D. (2015). Drug resistance in the microaerophilic parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(3), pp. 128-135.

- Lev, B., Ward, H., Keusch, G. y Pereira, M. (1986). Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: A novel host-parasite interaction. *Science*, 232(4746), pp.71-73.
- Luján, H., Mowatt, M., Wu, J., Lu, Y., Lees, A., Chance, M. y Nash, T. (1995). Purification of variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding. *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), pp. 13807-13813.
- Martinez-Gordillo, M. N., Gonzalez-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Montijo-Barrios, E. y Ponce-Macotela, M. (2014). Intraepithelial *Giardia intestinalis*: A case report and literature review. *Medicine*, 93(1), pp. 1-5.
- Monis, P., Mayrhofer, G., Andrews, R., Homan, W., Limper, L., y Ey, P. (1996). Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology*, 112(Pt1), pp. 1-12.
- Monis, P., Andrews, R., Mayrhofer, G. y Ey, P. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), pp. 1135-1144.
- Morecki, R. y Parker J. (1967). Ultrastructural studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in subjects with steatorrhea. *Gastroenterology*. 52(2), pp. 151-164.
- Monis, P., Cacció, S. y Thompson, R. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25(2), pp. 93-100.

Morrison, H., McArthur, A., Gillin, F., Aley, S., Adam, R., Olsen, G., Best, A., Cande, W., Chen, F., Cipriano, M., Davids, B., Dawson, S., Elemendorf, H., Hehl, A., Holder, M., Huse, S., Kim, U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G. y Nigam, A. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 317(5846), pp. 1921-1926.

Müller, J., Hemphill, A. y Müller, N. (2011). Treatment of giardiasis and drug resistance. In: Lujan, H. y Svärd, S. *Giardia Giardia a model organism*. Wien: Springer. pp 17-28.

Noemí, I. (2013). Capítulo 18. Giardiasis. pp. 145. En: Apt, W. *Parasitología Humana*. McGraw-Hill. México. D.F.

Pickering, L., Woodward, W., DuPont, H. y Sullivan, P. (1984). Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. *The Journal Pediatrics*, 104(4), pp. 522-526.

Pimenta, P., da Silva, P. y Nash, T. (1991). Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick coat: thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infection and Immunity*, 59(11), pp. 3989-3996.

Ponce-Macotela, M., Martínez-Gordillo, M. Álvarez-Chacón, R. (1990). Obtención y cultivo de *Giardia* spp. *Infectología*. 10(1), pp. 91-95.

Ponce-Macotela, M., Navarro-Alegría, I., Martínez-Gordillo, M. N. y Álvarez-Chacón, R. (1994). Efecto anti-giardiasis *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Revista de investigación clínica*, 46(1), pp. 343-347.

- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R. y Martínez-Gordillo, M. (2006). Oregano (*Lippiaspp*) kills *Giardia intestinalis* trophozoites *in vitro*: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitology Research*, 98(6), pp. 557-560.
- Ponce-Macotela, M., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R. y Martínez-Gordillo, M. (2008). Goblet cells: are they the first unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? *Parasitology Research*, 102(3), pp. 509-513.
- Ponce-Macotela, M. y Martínez-Gordillo, M. (2014). Giardiasis. pp. 64-65. En: Becerril-Flores, M. *Parasitología Médica*. Cuarta edición. McGraw-Hill, México. D.F.
- Ponting, C. y Aravind, L. (1999). STAR: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signaling proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(4), pp. 130-132.
- Quezada, R. y Ortega, M. (2017). Giardiasis. *Ciencias*, 1(68), pp. 34-37.
- Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G., Javalera-Duarte, A., Ponce-Martinez, J., Valbuena-Gregorio, E. y López-Mata, M. (2017). Prevalence and associated risk factors for *Giardia* and *Cryptosporidium* infections among children of northwest Mexico: a cross-sectional study. *BMC Public Health*, 17(1), p. 852.
- Radulescu, S. y Meyer, E. (1984). *In vitro* cultivation of *Giardia* trophozoites pp. 99-109. En: Meyer, E. Giardiasis. *Elsevier Science Publishers B. V.*

- Rayani, M., Unyah, N. y Hatam, G. (2013). Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from fars province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 9(1), pp. 70-78.
- Rendtorff, R. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *American Journal of Epidemiology*, 59(3), pp. 209-220.
- Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-Lopez, L., Ramos-Morales, A., Martinez-Gordillo, M., y Gonzalez-Maciel, A. (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an *in vivo* model. *Nature*. 5(1), 15168.
- Rodríguez-Ulloa, C. y Rivera-Jacinto, M. (2011). ELISA y técnica de sedimentación espontánea para el diagnóstico de infección por *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños en Perú. *Salud pública de México*, 53(1), pp. 516-519.
- Rosoff, J., y Stibbs, H. (1986). Physical and chemical characterization of *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(6), pp. 1079-83.
- Rosoff, J.y Stibbs, H. (1986). Insolation and identification of *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), pp. 905-910.
- Ruggiero, M., Gordon, D., Orrell, T., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. y Kirk, P. (2015).Correction: A higher level classification of all living organism. *PLOS ONE*, 10(6), p.e119248.

- Saha, T. y Ghosh, T. (1977). Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology*, 72(3), pp. 402-405.
- Savioli, L., Smith, H. y Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends in Parasitology*, 22(5), pp. 203-208.
- Schmitt, E. y Roberts, L. (1985). *Foundations in parasitology*, 3rd ed. p.754.
- Sherling, S. y van Ooji, C. (2016). Host cell remodeling by pathogens: the exomembrane system in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *FEM Microbiology Reviews*, 40(5), pp. 701-721.
- Sinelokov, I., Sion-Vardy, N. y Shaco-Levi, R. (2009). C-kit (CD117) immunostaining is useful for the diagnosis of *Giardia lamblia* in duodenal biopsies. *Human Pathology*. 40(3), pp. 323-325.
- Singer, S., Elmendorf, H., Conrad, J. y Nash, T. (2001). Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(1), pp. 119-24.
- Singh, K., Bhasin, D., Rana, S., Vaiphei, K., Katyal, R. y Singh, K. (2000). Effect of *Giardia lamblia* on duodenal disaccharidase levels in humans. *Tropical Gastroenterology*, 21(4), pp.174-176.
- Soares, R. Tasca, T. (2016). Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of Microbiological Methods*, 129(1), pp. 98-102.

- Stocco, D. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology*, 63(1), pp. 193-213.
- Studier, F. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), pp. 207-234.
- Tay, J. y Velasco, O. (2002). *Parasitología Médica*. Capítulo 7. Giardiosis. Méndez Editores. México. D.F. pp.88.
- Thermo, (s. a). Ni-NTA purification system. Manual de usuario 25-0496.
- Thompson, R. (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), pp.1259-1267.
- Thompson, R. y Monis, P. (2004). Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, 58(1), pp. 69-137.
- Troeger, H., Eppler H., Schneider, T., Wahnschaffe U., Ullrich, R., Burchard, G., Jelinek T., Zeitz, M., Fromm, M. y Schulzke, J. (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56(3), pp. 328-33.
- Upcroft, J., Upcroft, P. y Boreham, P. (1990). Drug resistance in *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, 4(20), pp. 489-496.
- Watkins, R. y Eckmann L. (2014). Treatment of giardiasis: status and future directions. *Current Infectious Disease Reports*, 16(2), pp. 396-404.

- Weeratunga, S., Osman, A., Hu, N., Wang, C., Mason, L., Svard, S., Hope, G., Jones, M. y Hofmann, A. (2012). Alpha-1 giardin is an annexin with highly unusual calcium-regulated mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 423(2), pp. 169-181.
- Weiland, M., Palm, J., Griffiths, W., McCaffery J. y Svärd, S. (2003). Characterization of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *International Journal for Parasitology*, 33(12), pp. 1341-1351.
- WHO, The World Health Report. (1996). Fighting Disease Fostering Development. *World Health Organization*, Geneva.
- Xu, J., Banerjee, A., Pan, S. y Li, Z. (2012). Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. *Protein expression and purification*, 83(1), pp. 30-36.
- Yichoy, M., Duarte, T., De Chatterjee, A., Aguilera, K., Roy, D., Roychowdhury, S., Aley S. y Das, S. (2011). Lipid metabolism in *Giardia*: a post-genomic perspective. *Parasitology*, 138(3), pp.267-278.
- Vazquez, O. y Campos, T. (2009). Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro Investigación*, 8 (31), pp. 80-90.